



**THESE DE DOCTORAT DE  
L'UNIVERSITE PIERRE ET MARIE CURIE**

Spécialité

PHYSICO-CHIMIE ANALYTIQUE  
(Ecole Doctorale de Chimie Physique et de Chimie Analytique de Paris-Centre – ED 388)

Présentée par

M. Guillaume LONGATTE

Pour obtenir le grade de

**DOCTEUR de l'UNIVERSITÉ PIERRE ET MARIE CURIE**

Sujet de la thèse :

Dérivation des électrons photosynthétiques par des médiateurs de type quinone.

Soutenance prévue le 23.09.2015

Devant le jury composé de :

M. Mathieu ETIENNE	Rapporteur
Mme Elisabeth LOJOU	Rapporteur
Mme Sabine SZUNERITS	Examineur
M. Didier DEVILLIERS	Examineur
M. Fabrice RAPPAPORT	Examineur
M. Christian AMATORE	Directeur de thèse
M. Frédéric LEMAITRE	Co- directeur de thèse
Mme Manon GUILLE COLLIGNON	Co-encadrante





**THESE DE DOCTORAT DE  
L'UNIVERSITE PIERRE ET MARIE CURIE**

Spécialité

PHYSICO-CHIMIE ANALYTIQUE  
(Ecole Doctorale de Chimie Physique et de Chimie Analytique de Paris-Centre – ED 388)

Présentée par

M. Guillaume LONGATTE

Pour obtenir le grade de

**DOCTEUR de l'UNIVERSITÉ PIERRE ET MARIE CURIE**

Sujet de la thèse :

Dérivation des électrons photosynthétiques par des médiateurs de type quinone.

Soutenance prévue le 23.09.2015

Devant le jury composé de :

M. Mathieu ETIENNE	Rapporteur
Mme Elisabeth LOJOU	Rapporteur
Mme Sabine SZUNERITS	Examineur
M. Didier DEVILLIERS	Examineur
M. Fabrice RAPPAPORT	Examineur
M. Christian AMATORE	Directeur de thèse
M. Frédéric LEMAITRE	Co- directeur de thèse
Mme Manon GUILLE COLLIGNON	Co-encadrante



# Remerciements

En premier lieu, je tiens à remercier Christian Amatore pour m'avoir accueilli dans son groupe, avoir accepté de diriger cette thèse et m'avoir aidé pour mes recherches de post-doc. Je le remercie également pour l'ensemble des discussions que nous avons eues durant ces 3 années, qui ont permis d'illustrer son éternel sens de l'humour. Je remercie de même Ludovic Jullien pour son accueil dans le laboratoire.

Je tiens également à remercier Frédéric Lemaître et Manon Guille Collignon pour m'avoir proposé ce sujet de thèse et m'avoir encadré au quotidien pendant ces 3 années. Je les remercie pour tous leurs apports tant scientifiques que pédagogiques mais également pour la bonne humeur qu'ils ont su montrer au cours de ces trois années.

Je remercie également Fabrice Rappaport pour son expertise sur la photosynthèse ainsi que sur les techniques de fluorescence, qui s'est révélée indispensable au cours de ces 3 années sans toutefois abandonner la modestie et la gentillesse qui le caractérisent. Je remercie aussi Francis-André Wollman pour m'avoir accueilli au laboratoire.

Je remercie également Sandrine Bujaldon pour son aide au sujet de tous les aspects de culture cellulaire des algues, agrémentée par une personnalité vive et sympathique, ainsi que Han-Yi Fu pour son expertise sur les aspects biologiques ainsi que son travail de post-doc sur ce projet.

Je remercie également Mme Elisabeth Lojou et M. Mathieu Etienne pour avoir accepté d'être rapporteurs de ce travail, ainsi que Mme Sabine Szunerits et M. Didier Devilliers pour avoir accepté de l'évaluer. J'espère que la lecture vous sera agréable.

Je remercie également Jérôme Delacotte, pour ses conseils éclairés en biophysique, sur les présentations effectuées et pour sa relecture du manuscrit.

Je remercie également Eric Labbé et Olivier Buriez pour leur collaboration à l'étude électrochimique, ainsi que Laurent Thouin et Catherine Sella pour m'avoir accueilli dans

leur bureau pendant les travaux.

Je remercie également Adnan Sayegh pour le sérieux et la motivation qu'il a montrés dans son stage de M2, me permettant de me consacrer davantage à la rédaction de ce manuscrit, ainsi que pour son caractère qui a rendu ces 6 mois très agréables.

Je remercie enfin tous les personnels de l'IBPC (Benjamin, Danielle, Félix, Sandrine, Marina, Yves, Catherine, Dominique, Marc, Pierre, Richard, Sophie, les deux Wojciech, Olivier, Katia...) pour leur accueil chaleureux dans leur équipe entre autres polish party.

Pour finir je remercie également tous les autres personnels du laboratoire (Laurence, Anny, Alexandra, Sacha, Irina, Cécile, Eric) pour leur contribution à la bonne ambiance du laboratoire pendant ces trois années.

Enfin je remercie tous les étudiants du groupe pour ces trois années hautes en couleurs (Cong, Wided, Pierluca, Yun, Pierre, Dali, Lillian, Xiaoqing, Ana, Baptiste, Li Hui, Indira, Amélie, Pierre Adrien et en particulier Damien, pour sa relecture du manuscrit, et Thomas pour sa relecture du manuscrit et son aide lors des différentes présentations effectuées.

# Table des matières

<b>Table des abbréviations</b>	<b>9</b>
<b>Liste des notations</b>	<b>10</b>
<b>Introduction</b>	<b>13</b>
<b>1 Présentation de la problématique</b>	<b>17</b>
1.1 Structure de la chaîne photosynthétique . . . . .	17
1.1.1 Vue d'ensemble de la chaîne photosynthétique . . . . .	17
1.1.2 Le photosystème II . . . . .	19
1.2 Le phénomène photosynthétique, un phénomène d'efficacité limitée . . . . .	21
1.2.1 Nature de la limitation . . . . .	21
1.2.2 Le stress lumineux, une conséquence de la limitation . . . . .	24
1.2.2.1 Stress lumineux dû à la Photoinhibition du site donneur . . . . .	24
1.2.2.2 Stress lumineux dû à la Photoinhibition du site accepteur . . . . .	25
1.2.2.3 La photoréparation . . . . .	28
1.2.2.4 Photoinhibition : bilan . . . . .	30
1.3 Minimisation de la photoinhibition du site accepteur : les différentes ap- proches . . . . .	32
1.3.1 Extraction directe du surplus d'électrons photosynthétiques par une électrode . . . . .	32
1.3.1.1 Nanoélectrodes insérées dans le chloroplaste de cellules vi- vantes . . . . .	32
1.3.1.2 Membranes thylakoïdes isolées déposées sur une électrode . . . . .	34
1.3.1.3 Stratégie du biofilm . . . . .	35

1.3.2	Utilisation d'accepteurs du photosystème II . . . . .	36
1.3.2.1	Comparaison des efficacités des accepteurs d'électrons . . .	36
1.3.2.2	Aspects mécanistiques . . . . .	38
1.3.2.2.1	Cas du ferricyanure . . . . .	38
1.3.2.2.2	Cas des quinones . . . . .	39
1.3.2.2.3	Quels accepteurs choisir ? . . . . .	40
1.3.2.3	Transfert d'électrons photosynthétiques médié . . . . .	41
1.3.2.3.1	Electrodes modifiées par des centres catalytiques pour transfert d'électron médié . . . . .	41
1.3.2.3.1.1	Réalisation de bioanodes . . . . .	42
1.3.2.3.1.2	Réalisation de biopiles photosynthétiques . . . . .	44
1.3.2.3.2	Membranes thylakoïdes déposées sur des électrodes pour transfert d'électron médié . . . . .	46
1.3.2.3.3	Transfert d'électron médié sur cellules vivantes immobilisées . . . . .	50
1.3.2.3.4	Transfert d'électron médié sur cellules vivantes en suspension . . . . .	52
1.4	Conclusion . . . . .	53
<b>2</b>	<b>Evaluation de l'efficacité des médiateurs par fluorescence</b>	<b>57</b>
2.1	Introduction : principe expérimental . . . . .	57
2.1.1	La fluorescence, un phénomène directement lié au flux électronique	57
2.1.2	Quenching de la fluorescence de la chlorophylle par des quinones . .	58
2.1.3	Dispositif expérimental . . . . .	60
2.1.4	Allure des résultats expérimentaux . . . . .	61
2.1.5	Exploitation des résultats expérimentaux . . . . .	63
2.1.5.1	Approche empirique . . . . .	63
2.1.5.2	Sites ouverts/sites fermés, notion et utilisation . . . . .	64
2.1.5.2.1	Notion . . . . .	64
2.1.5.2.2	Utilisation pour l'exploitation des résultats . . . . .	65
2.2	Comparaison de l'efficacité des différents médiateurs . . . . .	65



2.2.1	Cas de la 2,6-DCBQ . . . . .	66
2.2.1.1	Dérivation électronique en fonction de la concentration in- troduite . . . . .	66
2.2.1.2	Observation du quenching . . . . .	67
2.2.1.3	Extraction de paramètres numériques caractéristiques de la dérivation électronique . . . . .	70
2.2.2	Comparaison des différents médiateurs . . . . .	71
2.3	Etude mécanistique . . . . .	73
2.3.1	Mécanisme . . . . .	73
2.3.1.1	La dérivation électronique, une réaction réversible? . . . .	73
2.3.1.2	Proposition de mécanisme . . . . .	75
2.3.1.3	Implications du mécanisme . . . . .	76
2.3.2	Application du mécanisme : étude en fonction de la concentration et de l'intensité lumineuse . . . . .	81
2.3.2.1	Cas du mutant sans $b_6f$ . . . . .	81
2.3.2.1.1	Etude de l'influence de l'intensité lumineuse sur la proportion de sites ouverts en absence de qui- nones . . . . .	82
2.3.2.1.2	Evolution de la proportion de sites ouverts en fonction de la concentration en quinones . . . . .	82
2.3.2.1.3	Influence du flux de photons incident sur la valeur de $D_\infty$ . . . . .	84
2.3.2.1.4	Influence du flux de photons incident sur $\rho_0$ . . . .	86
2.3.2.1.5	Flux endogène et exogène . . . . .	86
2.3.2.1.6	Extension et analyse du système . . . . .	88
2.3.2.1.7	Conclusion . . . . .	90
2.3.2.2	Cas du Sauvage . . . . .	91
2.3.2.2.1	Etude de l'influence de l'intensité lumineuse sur la proportion de sites ouverts en absence de qui- nones . . . . .	92

2.3.2.2.2	Evolution de la proportion de sites ouverts en fonction de la concentration . . . . .	92
2.3.2.2.3	Influence du flux de photons incident sur la valeur de $D_{\infty}$ . . . . .	94
2.3.2.2.4	Influence du flux de photons incident sur $\rho_0$ . . .	94
2.3.2.2.5	Flux endogène et exogène . . . . .	94
2.3.2.2.6	Extension et analyse du système . . . . .	96
2.4	Etude de l'évolution temporelle du système . . . . .	98
2.4.1	Démonstration . . . . .	98
2.4.2	Simulations et Résultats . . . . .	99
2.5	Discussion . . . . .	100
2.6	Conclusion . . . . .	103

### 3 Etude du comportement électrochimique des composés de type quinone en milieu aqueux 105

3.1	Bibliographie générale sur le couple benzoquinone / hydroquinone . . . . .	105
3.1.1	Généralités . . . . .	105
3.1.2	Transferts d'électrons et de protons : modèle de Laviron . . . . .	106
3.1.2.1	Schéma carré à 4 espèces . . . . .	106
3.1.2.2	Schéma en échelle à 6 espèces . . . . .	108
3.1.2.3	Schéma carré à 9 espèces . . . . .	110
3.1.2.4	Conclusion et remise en contexte . . . . .	113
3.2	Etude expérimentale de l'oxydation de composés de type hydroquinone . .	115
3.2.1	Etude sur une électrode de carbone nue . . . . .	115
3.2.1.1	Cas du couple benzo/hydroquinone . . . . .	115
3.2.1.1.1	Etude de l'hydroquinone . . . . .	115
3.2.1.1.2	Différence de comportement entre la benzoquinone et l'hydroquinone . . . . .	116
3.2.1.2	Cas des autres médiateurs . . . . .	119
3.2.2	Influence d'un prétraitement surfacique de l'électrode . . . . .	122
3.2.2.1	L'état de l'art . . . . .	122

3.2.2.2	Résultats expérimentaux . . . . .	123
3.2.2.2.1	Cas des quinones sans substituants chlorés . . . .	124
3.2.2.2.2	Cas des dichloro-benzoquinones . . . . .	126
3.2.3	Mesure du nombre d'électrons . . . . .	126
3.2.3.1	Présentation de la méthode . . . . .	126
3.2.3.2	Résultats expérimentaux . . . . .	129
3.3	Conclusion . . . . .	130
<b>4</b>	<b>Etude d'une régénération électrochimique des quinones photoréduites par la chaîne photosynthétique</b>	<b>133</b>
4.1	Prédictions théoriques . . . . .	133
4.1.1	Etude de la proportion de sites ouverts stationnaires aux temps longs	134
4.1.2	Etude de la dynamique à laquelle le courant stationnaire est atteint	138
4.1.2.1	Formalisme et mathématisation . . . . .	138
4.1.2.2	Résultats et discussion . . . . .	140
4.2	Résultats expérimentaux . . . . .	144
4.2.1	Photocourants, cas de la 2,6-DCBQ . . . . .	144
4.2.1.1	Acquisition et traitement de données . . . . .	144
4.2.1.2	Essais en fonction de la concentration et de l'intensité lumineuse sur un mutant sans $b_6f$ de <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> . . . . .	145
4.2.1.3	Expériences sur une lignée sauvage . . . . .	148
4.2.1.4	Conclusion . . . . .	149
4.2.2	Evolution dans le temps des photocourants observés . . . . .	150
4.2.2.1	Discussion sur la possibilité de l'apparition d'un quenching cinétique . . . . .	150
4.2.3	Quenching cinétique et quenching spontané, des phénomènes déconvoluables ? . . . . .	151
4.2.3.1	Etude du quenching cinétique . . . . .	153
4.2.3.2	Résultats expérimentaux . . . . .	154
4.2.3.2.1	Comparaison des différentes quinones . . . . .	154

4.2.3.2.2	Etude de la 2,6-DCBQ en fonction de la concentration . . . . .	156
4.2.3.3	Evolution de la proportion de sites ouverts . . . . .	157
4.2.3.4	Evolution des photocourants au cours du temps : cas de la 2,6-DCBQ . . . . .	159
4.2.3.5	Evolution des photocourants au cours du temps : cas de la PPBQ . . . . .	162
4.3	Conclusion . . . . .	164
<b>Conclusion générale</b>		<b>166</b>
<b>Partie expérimentale</b>		<b>169</b>
<b>Bibliographie</b>		<b>173</b>
<b>Liste des figures</b>		<b>189</b>
<b>Liste des Tableaux</b>		<b>203</b>

# Table des abbréviations

<b>2,6-DCBQ</b>	2,6-Dichlorobenzoquinone .....	37
<b>2,5-DCBQ</b>	2,5-Dichlorobenzoquinone .....	37
<b>2,6-DMBQ</b>	2,6-Diméthylbenzoquinone .....	56
<b>2,5-DMBQ</b>	2,5-Diméthylbenzoquinone .....	40
<b>ATP</b>	Adénosine TriPhosphate .....	19
<b>BQ</b>	Benzoquinone .....	40
<b>LHC</b>	Light Harvesting Complex .....	29
<b>NADPH</b>	Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate réduit .....	18
<b>PPBQ</b>	Phényl-para-Benzoquinone .....	37
<b>PQ</b>	Plastoquinone .....	19
<b>PQH<sub>2</sub></b>	Plastoquinol .....	19
<b>PSI</b>	Photosystème I .....	18
<b>PSII</b>	Photosystème II .....	18
<b>WOEC</b>	Water Oxidizing Evolving Complex .....	20
<b>DCMU</b>	Diuron (3-(3,4-DiChlorophenyl)-1,1-diMethylUrea) .....	24
<b>ITO</b>	Indium dopé à l'oxyde d'étain .....	35
<b>NBQ</b>	Naphtobenzoquinone .....	56
<b>RPE</b>	Résonance Paramagnétique Electronique .....	27



# Liste des notations

b	Ratio des cinétiques d'arrivée de la quinone exogène au site réactionnel sur la cinétique de transfert d'électrons.
$D_{\infty}$	Proportion de sites ouverts pour une concentration infinie en quinones
f	Concentration normalisée par une concentration de référence de 1 $\mu\text{M}$
$F(I)$	Constante de vitesse de la photoréduction de $Q_A^-$
$F_0$	Fluorescence mesurée en absence d'irradiation.
$F_{max}$	Fluorescence mesurée au niveau d'un pulse de lumière sursaturante.
$F_{stat}$	Fluorescence stationnaire mesurée sous une irradiation voulue.
k	Rapport de l'efficacité de la régénération électrochimique et de la dérivation électronique limitée par l'arrivée de la quinone au site réactionnel
$k_{endo}$	Constante de vitesse de réoxydation de $Q_A^-$ par le flux endogène.
$k_Q$	Constante de vitesse de l'arrivée de la benzoquinone exogène au site réactionnel
$k_{-Q}$	Constante de vitesse du départ de la benzoquinone exogène du site réactionnel
$k_e$	Constante de vitesse d'oxydation de $Q_A^-$ par la benzoquinone fixée.
$k_{-e}$	Constante de vitesse de la réaction de transfert d'électrons inverse.
$k_{dQ}$	Constante de vitesse de libération du site réactionnel par la quinone réduite
$\alpha$	Concentration en quinone normalisée par la concentration pour laquelle les rendements des flux exogènes et endogènes sont égaux.
$\beta$	Paramètre rendant compte de la limitation du flux exogène par l'arrivée de la quinone ou par la cinétique de transfert d'électrons.
$\zeta$	$\frac{\rho_0 C_0}{D_{\infty}}$

$\Xi$	Rendement du flux endogène
$\rho_0$	Pente initiale du flux exogène en fonction de la concentration en quinones
$\sigma$	$\rho_0 C_0$
$\tau$	Temps normalisé par une durée caractéristique du système considéré
$\phi_0$	Proportion de sites ouvert en absence de quinones.
$\psi$	Courant adimensionné
$\Psi$	Rendement du flux exogène



# Introduction

La photosynthèse est le processus qui permet, au bilan, la conversion de l'eau et du dioxyde de carbone en matière carbonée réduite et en dioxygène à travers la conversion de l'énergie lumineuse en énergie chimique. Dans la mesure où l'énergie lumineuse reçue par la Terre en provenance du soleil excède largement les besoins énergétiques de l'humanité, le contexte environnemental actuel (épuisement des ressources en énergie fossile, réchauffement climatique...), rend cette source potentielle d'énergie extrêmement attractive.

En effet, la photosynthèse est un processus intrinsèquement bridé sous forte irradiation à cause de la saturation de l'efficacité d'une étape de transfert d'électrons, ce qui a pour conséquence que seuls 4 % de l'énergie solaire disponible sont convertis en énergie chimique. De plus, ceci est susceptible d'engendrer une dénaturation de l'appareil photosynthétique. Il pourrait donc être envisagé de chercher à profiter de cette saturation en créant une voie secondaire d'écoulement des électrons excédentaires. L'énergie lumineuse inutilisée pourrait être alors convertie en énergie électrique, tout en maintenant la synthèse de matière carbonnée réduite. De plus l'endommagement du système observé sous forte irradiation pourrait être ainsi diminué.

De nombreuses stratégies visant à réaliser une telle extraction d'électrons photosynthétiques ont déjà été proposées, et ce par différents types d'outils. On peut citer la récupération de ces électrons à travers un processus chimique à l'aide d'accepteurs d'électrons exogènes, étudiée dans les années 80. Ces études mettent principalement en jeu des oxydants tels que le ferricyanure ou encore des dérivés de type quinone. Le transfert d'électrons direct depuis la chaîne photosynthétique vers une nanoélectrode a également été étudié. Cela peut se faire en extrayant des unités photosynthétiques et en les déposant sur une électrode, ce qui a été réalisé pour la première fois en 1990 et repris très récemment. En 2010, il a été envisagé d'insérer une nanoélectrode dans le chloroplaste d'une algue.

Enfin, de nombreux exemples impliquant un transfert d'électrons médié entre la chaîne photosynthétique et l'électrode, soit seul soit en complément d'un transfert d'électrons direct, ont été publiés récemment dans la littérature. Ces exemples mettent principalement en jeu des sous unités photosynthétiques extraites à des échelles diverses. Cependant des exemples de ce type d'approche sur un organisme pris dans son intégralité ont été publiés très récemment. Néanmoins, toutes ces études ont pour point commun d'immobiliser les cellules à la surface de l'électrode. Il est à noter que des approches sur de tels organismes en suspension avaient été publiés, uniquement dans des conditions purement analytiques, au début des années 2000.

Il s'agit au bilan d'une thématique qui, bien que née dans les années 80, est en plein essor depuis quelques années notamment à travers la contribution de groupes de bioélectrochimie (Wolfgang Schuhman, Christopher Howe, Lo Gorton...). Toutefois, au départ d'une thématique commune, les objectifs des auteurs divergent tout au long de ces études. Ainsi les études sur l'oxydation en solution sont effectuées à des fins biologiques, alors que les transferts d'électrons direct sont plus utilisés à des fins de développement de capteurs. Les dispositifs de transferts d'électrons médiés sont développés, quant à eux, à des fins énergétiques, dans le but de générer des courants le plus fort possible.

L'approche présentée dans ce manuscrit présente l'originalité d'utiliser des organismes dans leur intégralité maintenus en suspension, et de chercher à obtenir un système permettant de travailler dans des conditions préparatives. L'organisme étudié sera l'algue unicellulaire *Chlamydomonas reinhardtii*. La présence de l'électrode aura donc une réelle influence sur l'environnement de l'algue. Si la problématique développée est de chercher à maintenir l'activité photosynthétique, à savoir d'éviter la dénaturation de l'appareil photosynthétique, dans les faits aucune limitation ne sera complètement prise. Le but de l'étude est de développer un outil permettant de dériver les électrons photosynthétiques de l'algue *Chlamydomonas reinhardtii* vers une électrode par un transfert d'électron médié à l'aide de molécules de type benzoquinone. Ceci pourra être appliqué tant d'un point de vue énergétique (génération de photocourants), que biologique (maintien de l'activité photosynthétique) et fondamental (utilisation du courant comme un signal permettant d'étudier la réponse de l'algue à différentes perturbations). Dans l'ensemble des études menées, si une attention particulière est portée aux observations empiriques dans le but

de concevoir le dispositif, des tentatives d'interprétation des phénomènes observés seront aussi présentées.

Ce manuscrit sera divisé en 4 chapitres :

- Dans le premier chapitre, une description de l'appareil photosynthétique présent chez *Chlamydomonas* sera présentée. Ceci permettra notamment de comprendre la nature de la limitation de la chaîne photosynthétique, ainsi que l'origine des dégâts que celle-ci est susceptible de provoquer et les moyens mis en oeuvre par la nature pour lutter contre ces phénomènes. De plus, les différentes approches de récupération des électrons photosynthétiques publiées dans la littérature mentionnées précédemment seront présentées et discutées.
- Dans le second chapitre, la capacité intrinsèque du médiateur à récupérer les électrons photosynthétiques sera étudiée par fluorescence sur un mutant de l'algue *Chlamydomonas reinhardtii*. Des complications expérimentales seront décrites à l'aide d'informations données dans la littérature conjointement à des résultats expérimentaux obtenus dans le cadre de cette étude. Le dispositif de fluorescence utilisé pour contourner ces complications est également décrit. Des phénomènes parallèles à la dérivation électronique seront également mis en lumière et interprétés puis quantifiés afin de mieux comprendre les résultats obtenus. Sur ces bases, une étude quantitative comparative des efficacités des différentes quinones envisagées a été effectuée. De plus, un essai de rationalisation des résultats observés sera décrit.
- Dans le troisième chapitre, l'étude de la capacité des différents types de quinone à être régénérés électrochimiquement après avoir été réduits dans l'algue sera présentée. Le comportement électrochimique global des quinones sera présenté au travers d'études bibliographiques publiées dans la littérature dans les années 80 et de nos résultats expérimentaux. Une possibilité de moduler ces propriétés électrochimiques publiée récemment sera également présentée, et son efficacité sur les différentes quinones ici étudiées sera discutée.
- Dans le quatrième chapitre, le comportement attendu du système électrochimique considéré sera décrit. Les résultats de photocourants seront présentés et discutés à la lumière de prédictions théoriques et d'expériences complémentaires de fluorescence.



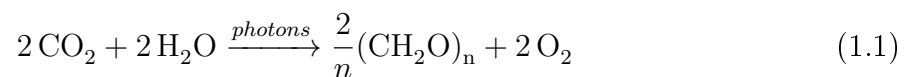
# Chapitre 1

## Présentation de la problématique

### 1.1 Structure de la chaîne photosynthétique

#### 1.1.1 Vue d'ensemble de la chaîne photosynthétique

La photosynthèse oxygénique est un processus qui, globalement, permet la conversion de l'eau et du  $\text{CO}_2$  en dioxygène et en matière carbonée réduite. L'équation-bilan de cette réaction peut être donnée ci-dessous :



Cette réaction se produit au sein d'un organe appelé chloroplaste. Sa structure est schématisée (figure 1.1).

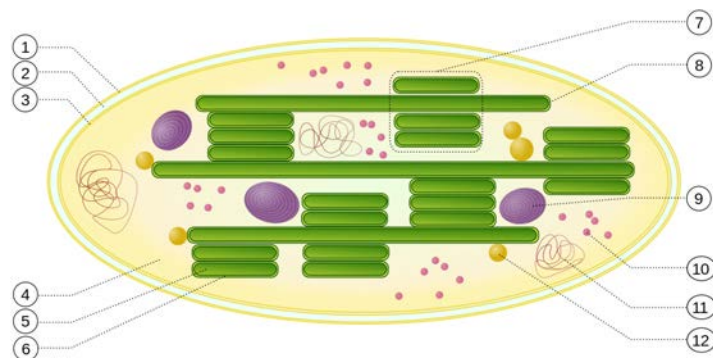


FIGURE 1.1: Schéma de la structure d'un chloroplaste, (1) membrane externe et (3) interne, (2) espace intermembranaire, (4) stroma, (5) lumen, (6) membrane du thylakoïde, (7) granum, (8) thylakoïde, (9) amidon, (10) ribosome, (11) ADN chloroplastique, (12) gouttellette lipidique [1].

Les chloroplastes sont des organites compartimentés et contiennent en particulier les thylakoïdes, qui baignent dans le stroma (milieu intrachlororoplaste) et qui renferment un autre milieu appelé lumen. La membrane des thylakoïdes contient les entités biologiques responsables de la photosynthèse. Cette membrane est schématisée en figure 1.2.

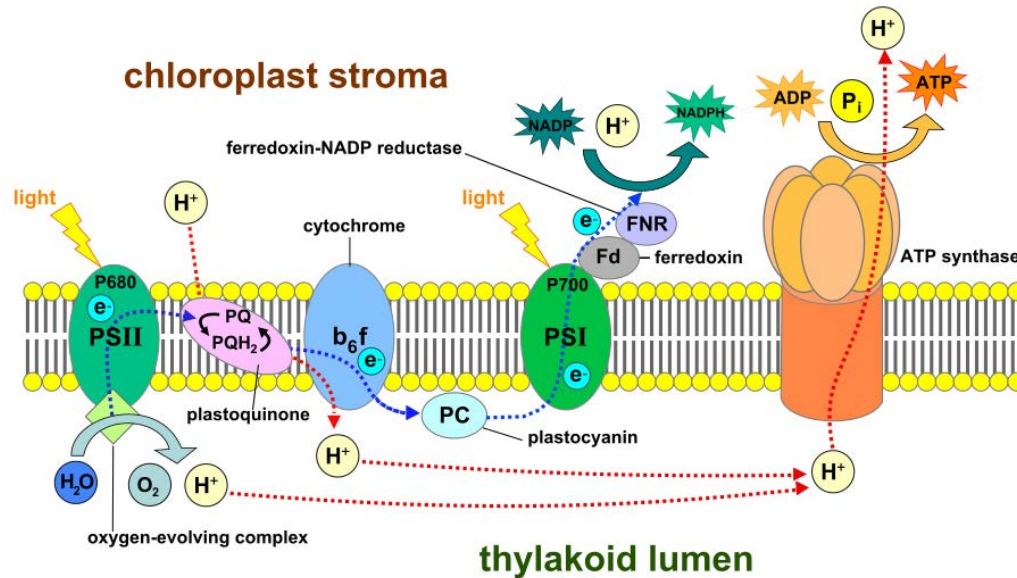


FIGURE 1.2: Schéma en coupe d'une membrane thylakoïde [2].

Ce type de phototrophe (organisme photosynthétique) est constitué notamment de deux photocentres appelés Photosystème II (PSII) et Photosystème I (PSI). Le PSII permet l'oxydation de l'eau via l'excitation d'un dimère de chlorophylle noté  $P_{680}$ . Cette excitation peut se faire par irradiation directe de ce dernier ou par transfert énergétique depuis les chlorophylles de l'antenne irradiée (protéine rassemblant un grand nombre de chlorophylle à proximité du  $P_{680}$ ).

Les électrons ainsi générés vont circuler le long de la chaîne photosynthétique en passant par différents intermédiaires (pool de plastoquinones, cytochrome, plastocyanine...) jusqu'au PSI. L'irradiation de ce dernier va permettre un gain en énergie de ces électrons, conduisant via différents intermédiaires, à la formation de Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate réduit (NADPH), cette réaction consommant un proton.

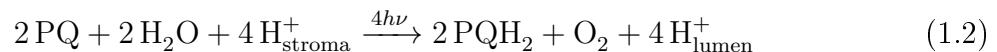
Au cours du processus, des protons sont consommés dans le stroma (milieu externe aux thylakoïdes) au niveau du pool de plastoquinones comme au niveau de la synthèse de NADPH. De plus des protons sont produits dans le lumen (milieu interne aux thylakoïdes)

au niveau du pool de plastoquinones et du PSII. Une différence de potentiel chimique du proton est donc établie de part et d'autre des membranes thylakoïdes, et sert de force motrice à la génération d'Adénosine TriPhosphate (ATP). L'ATP et le NADPH ainsi générés vont conduire à la réduction du  $\text{CO}_2$  via un mécanisme appelé cycle de Calvin (non représenté sur la figure 1.2), permettant de retrouver le bilan de la photosynthèse évoqué ci-dessus.

L'élément-clé dans le cadre de cette étude est le photosystème II. Les étapes de transferts d'électrons qui s'y déroulent seront donc présentées avec plus de détails dans le présent chapitre.

### 1.1.2 Le photosystème II

La réaction qui se produit au sein du photosystème II peut s'écrire comme suit (avec PQ signifiant plastoquinone et  $\text{PQH}_2$  plastoquinol soit la forme doublement réduite et protonnée de la plastoquinone) :



Le schéma décrivant plus précisément les différents acteurs de la photosynthèse, notamment au niveau du photosystème II, est reproduit en figure 1.3.

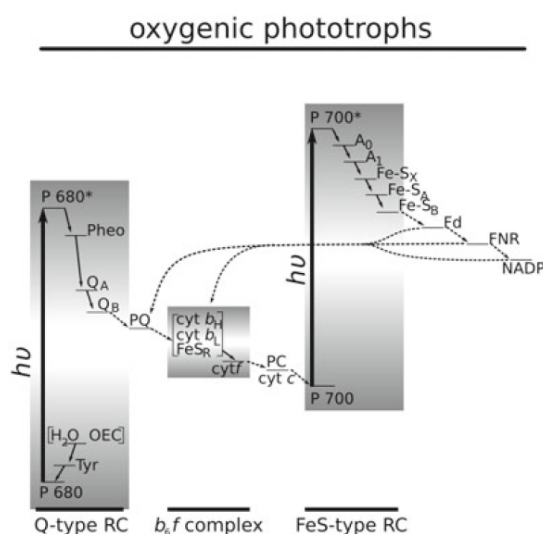
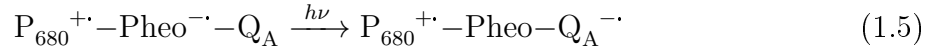
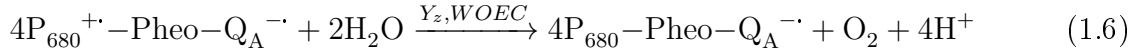


FIGURE 1.3: Schéma de la chaîne photosynthétique pour des phototrophes oxygéniques [3].

Comme mentionné précédemment, l'élément chromophore dans la structure du photosystème II est appelé  $P_{680}$ . La première étape consiste en une absorption de photons, qui induit une séparation de charges puis la stabilisation de cette dernière, selon la séquence réactionnelle présentée ci-dessous (avec  $Q_A$  une quinone accepteur électronique endogène du PSII, et Pheo, la phéophytine, servant d'intermédiaire entre  $P_{680}^*$  et  $Q_A$ ).



Dans une seconde étape, la structure protéique  $P_{680}^{+\cdot}-\text{Pheo}^{-\cdot}-Q_A$  est reréduite par des électrons issus de l'oxydation de l'eau. Cette réaction est catalysée par le complexe de Water Oxidizing Evolving Complex (WOEC) et par la protéine  $Y_Z$ , selon l'équation bilan (1.6).



Le mécanisme catalytique mis en œuvre, nommé cycle de Kok [4] est représenté sur la figure 1.4 (avec Sn symbolisant les différents états du WOEC).

Il s'agit d'un mécanisme en 5 étapes car l'oxydation de l'eau fournit 4 électrons en une étape, alors que la réduction de la chaîne photosynthétique se produit en 4 étapes monoélectroniques.

Dans une troisième étape, les quinones  $Q_A^{-\cdot}$  vont réduire le pool de plastoquinones, via la fixation d'une plastoquinone sur un site nommé poche  $Q_B$  relié à  $Q_A$  via un atome de fer. Le terme de  $Q_B$  peut donc, par extension, désigner la quinone qui se trouve dans ce site. Ces transferts d'électrons se produisent selon un mécanisme en plusieurs étapes conduisant à la formation du plastoquinol  $PQH_2$  :





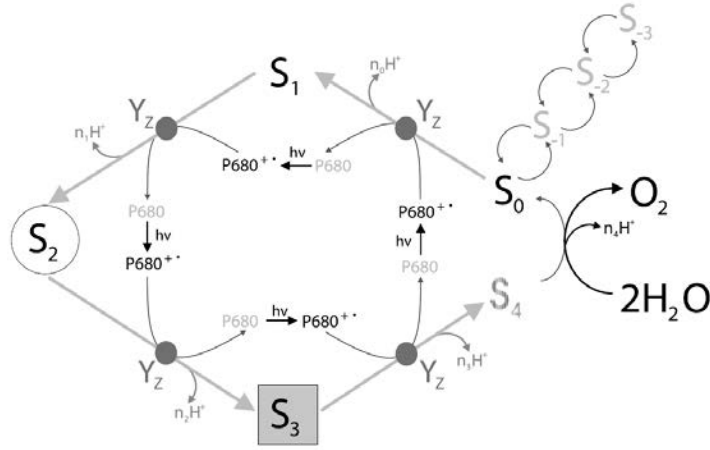
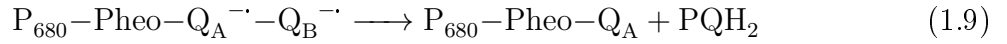


FIGURE 1.4: Représentation du cycle de Kok : oxydation catalytique de l'eau et réduction du photosystème II [4].



## 1.2 Le phénomène photosynthétique, un phénomène d'efficacité limitée

### 1.2.1 Nature de la limitation

Le mécanisme de transfert d'électrons depuis l'eau jusqu'au  $\text{CO}_2$  est bien connu depuis les années 80 et met en évidence une limitation de l'activité photosynthétique.

La grande majorité des transferts électroniques au long de la chaîne photosynthétique sont des transferts bi-électroniques. Au sein du complexe  $b_6f$  [5], l'un des transferts est mono-électronique (passage du pool de plastoquinones qui transportent 2 électrons, au cluster Fer-Soufre qui est monoélectronique). C'est pourquoi cette étape est nettement plus longue [6] (de l'ordre de 5 ms), comme le montre le schéma de la littérature reproduit sur la figure 1.5.

Le mécanisme le plus connu décrivant ce transfert d'électrons se nomme cycle Q [5, 8–11] (figure 1.6). Brièvement, celui-ci implique une fixation du plastoquinol au site noté  $Q_p$ , puis son oxydation selon un processus bi-électronique. L'un des électrons ainsi générés va circuler dans une voie dite à fort potentiel, conduisant au PSI, et donc à la synthèse

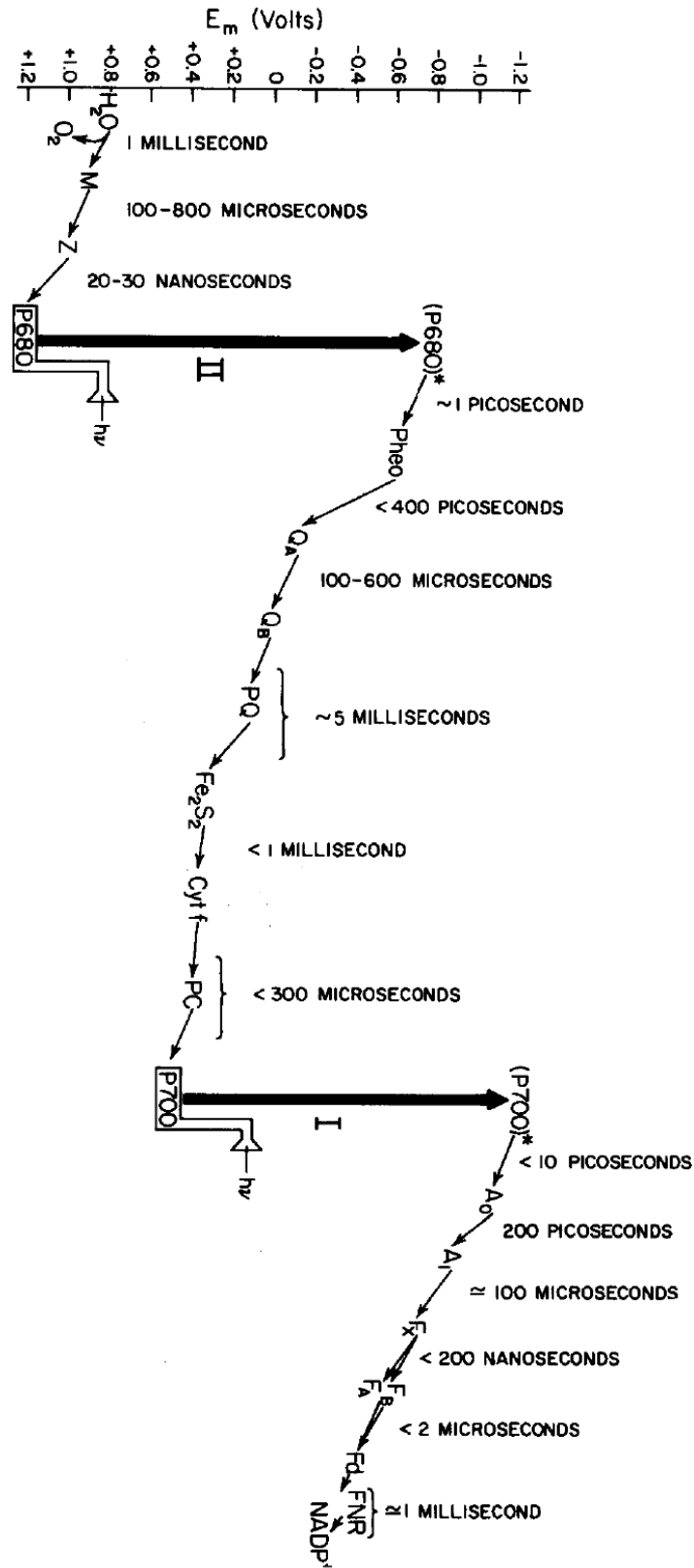


FIGURE 1.5: Schéma récapitulant les différentes étapes de transferts d'électrons le long de la chaîne photosynthétique, avec le temps caractéristique de chaque étape et le potentiel de demi-vague des couples rédox mis en jeu par rapport à l'ENH [7].

de NADPH. L'autre électron va quant à lui circuler dans une voie dite à faible potentiel, jusqu'à un site noté  $Q_n$ . Ce site permet la fixation d'une plastoquinone qui va pouvoir être réduite. De fait l'oxydation de deux plastoquinols aux sites  $Q_p$  permet le passage de deux électrons vers le PSI et de deux autres électrons vers le site  $Q_n$  permettant la réduction bi-électronique concertée de la plastoquinone. De plus, les protons émis lors de l'oxydation de  $PQH_2$  sont dans le lumen, alors que ceux utilisés lors de la réduction de PQ sont prélevés dans le stroma. Le cycle Q augmente donc la différence de potentiel chimique du proton dans entre le stroma et le lumen. Cette différence de potentiel sert de force motrice à la synthèse d'ATP.

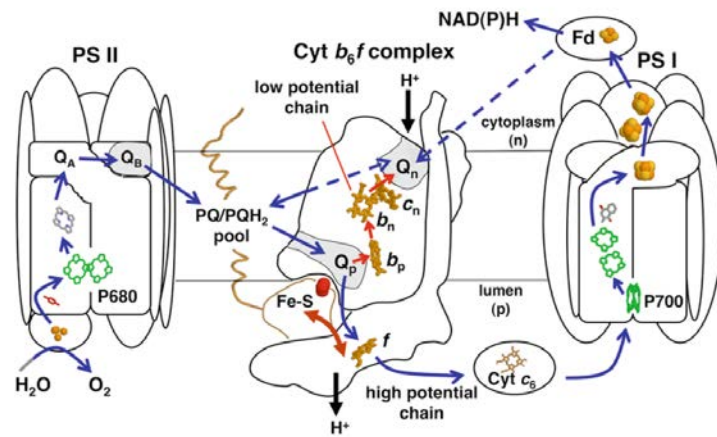


FIGURE 1.6: Schéma du transfert d'électrons du PSII au PSI, passant par un cycle Q au niveau du cytochrome  $b_6f$  [5].

On notera cependant que le cycle Q n'est pas le seul mécanisme possible décrivant ce "goulet d'étranglement électronique". D'autres mécanismes ont également été proposés dans la littérature [5,12–14], en impliquant notamment des formes semi-plastoquinones. La distinction entre ces mécanismes demeure à ce jour controversée [15,16] et est susceptible de dépendre des conditions expérimentales [15].

En conséquence de la présence de ce goulet d'étranglement, les sous-unités situées en amont de cette étape sont principalement sous leur forme réduite lorsque l'intensité lumineuse est suffisamment forte. L'efficacité du processus est alors bridée, car les charges ne peuvent plus être libérées par le photosystème II, ce qui constitue également une source potentielle de dommages cellulaires, via un phénomène appelé stress lumineux.

## 1.2.2 Le stress lumineux, une conséquence de la limitation

L'irradiation du photosystème II peut aboutir à la formation d'espèces réactives et potentiellement nocives pour lui si elle est trop intense par rapport aux capacités cinétiques de la chaîne photosynthétique. Ce phénomène est appelé stress lumineux [17]. La formation de ces espèces conduit à la dénaturation de la chaîne photosynthétique en général, et de la protéine D1<sup>1</sup> en particulier [18]. Ce phénomène est appelé photoinhibition.

Plus précisément, deux types de photoinhibition doivent être distingués, étant donné qu'ils divergent tant par leur origine que par la nature des espèces réactives photogénérées.

### 1.2.2.1 Stress lumineux dû à la Photoinhibition du site donneur

Comme décrit précédemment, suite à l'irradiation du PSII, un cation radical  $P_{680}^{+}$  est généré. Ce cation doit ensuite être réduit par des électrons issus de l'oxydation de l'eau via le WOEK et la Tyrosine Z. Si cette réduction est interrompue [19–23] (absence de donneurs électroniques, présence ou activité du WOEK altérée par des causes environnementales ou des modifications biologiques), ou trop fortement ralentie, les cations radicaux  $P_{680}^{+}$  photogénérés auront des temps de vie élevés. Or ces cations, en raison de leur fortes valeurs de potentiel standard (+1,3V/ENH) [24], sont susceptibles d'oxyder les protéines de leur environnement, causant alors des dommages sérieux au photosystème II, au cours de l'illumination.

Jegerschöld et al [22] ont ainsi montré qu'une inhibition chimique (délétion de chlorures, élément essentiel du fonctionnement du WOEK) de la réduction de  $P_{680}^{+}$  conduisait à l'apparition d'un phénomène de photoinhibition lors de l'irradiation. Ce phénomène peut être, à son tour, partiellement inhibé par l'ajout de chlorures en solution, qui peuvent remplacer ceux manquants au sein de la membrane.

Cette photoinhibition peut également être annihilée par l'ajout de Diuron (3-(3,4-DiChlorophenyl)-1,1-diMethylUrea) (DCMU), connu comme en tant qu'inhibiteur photosynthétique. Il est en effet connu pour avoir une grande affinité pour le site de fixation des plastoquinones au photosystème II, à savoir la poche  $Q_B$ . Il empêche donc de fait la libération d'un nombre significatif d'électrons par le PSII, empêchant donc la sépa-

---

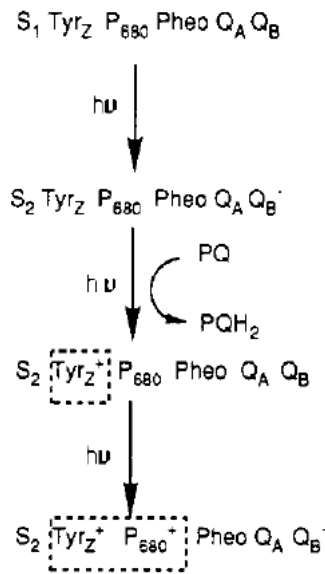
1. La protéine D1 est la protéine qui contient  $Q_A$  ainsi que le site  $Q_B$  permettant la fixation de la plastoquinone. Elle est donc essentielle au maintien du flux électronique.

ration de charges. Si celle-ci n'a plus lieu, l'irradiation ne génère plus de cation radical  $P_{680}^{+}$ . La protéine D1 se trouve de ce fait moins dégradée, ce qui est effectivement observé expérimentalement par les auteurs.

Les mécanismes en présence et en absence de DCMU sont regroupés au sein de la figure (1.7).

### Scheme I<sup>a</sup>

#### I No addition



#### II Presence of DCMU

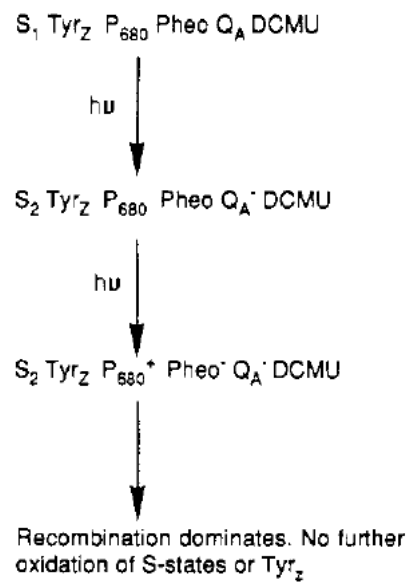


FIGURE 1.7: Schéma récapitulant l'activité antiphotoinhibition du site donneur par le DCMU sur des membranes thylakoïdes sans chlorures selon Jegerschöld et al [22].

Il est à noter que ce mécanisme reste encore aujourd'hui soumis à discussion. D'autres auteurs [25, 26] identifient comme première étape de photoinhibition du site donneur l'absorption de lumière par le WOE, conduisant à sa dénaturation inhibant de fait la réduction du cation radical. Néanmoins, le reste du mécanisme reste commun.

#### 1.2.2.2 Stress lumineux dû à la Photoinhibition du site accepteur

Une étude mécanistique poussée de ce type de photoinhibition a été effectuée par Vass et al en 1992 [27]. Des membranes PSII (membranes thylakoïdes ayant subi une délétion des éléments de la chaîne en aval du PSII) ont été soumis à une lumière de détection (de

faible intensité afin de ne pas déclencher de réduction significative du photosystème). Ceci permet la mesure de la fluorescence en absence de lumière, notée  $F_0$  issue de la chlorophylle. Puis une source de lumière actinique est appliquée, permettant de mesurer la fluorescence lorsque les sites sont fermés notée  $F_{max}$  (accepteurs électroniques réduits). Cette fluorescence subit une décroissance sous l'effet de l'application d'une lumière photoinhibitrice, d'intensité plus forte. Ce déclin de fluorescence est partiellement réversible dans le cas des conditions anaérobiques, l'extinction de la lumière photoinhibitrice conduisant alors à l'obtention d'une fluorescence notée  $F_{max,i}$ . L'extinction de la lumière actinique conduit à la mesure d'une fluorescence notée  $F_{0,i}$  supérieure à  $F_0$  (figure 1.8).

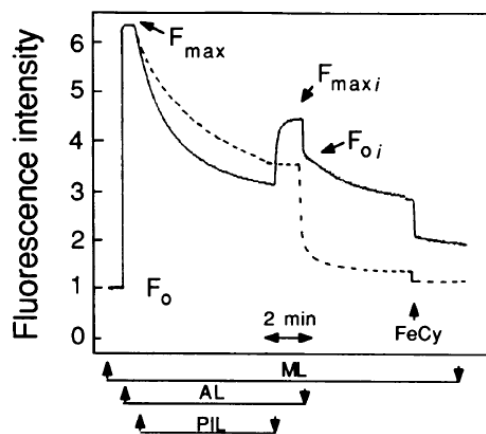


FIGURE 1.8: Fluorescence en fonction du temps suite à l'application de différentes lumières sur des photosystèmes II en suspension, ML lumière de détection, AL lumière actinique (qui provoque la réduction des accepteurs d'électrons du photosystème II et PIL lumière provoquant la photoinhibition) en conditions anaérobiques (trait continu) et aérobiques (pointillés), FeCy représentant un ajout de 70  $\mu$ M de ferricyanure [27].

Le fait que la fluorescence après l'arrêt de l'irradiation ( $F_{0,i}$ ) soit supérieure à la fluorescence avant l'irradiation ( $F_0$ ) signifie qu'une fraction des quinones  $Q_A$  reste sous forme réduite même après l'arrêt de la lumière actinique. Cela est confirmé par le fait que cette fluorescence voit sa valeur fortement diminuée par l'ajout d'un accepteur d'électrons exogène, ici l'anion ferricyanure. Dès lors, la diminution de cette fluorescence témoigne de la lente réoxydation de  $Q_A$ . Cette décroissance est décomposée par les auteurs en 4 phases qui sont appelées : rapide (temps de demi-vie de 0,5 minute), semi-stable (temps de demi-vie de 2 minutes), stable (temps de demi-vie de 30 minutes) et non-décroissante. Ces deux

dernières phases ne sont pas altérées par l'ajout d'un accepteur d'électrons exogène.

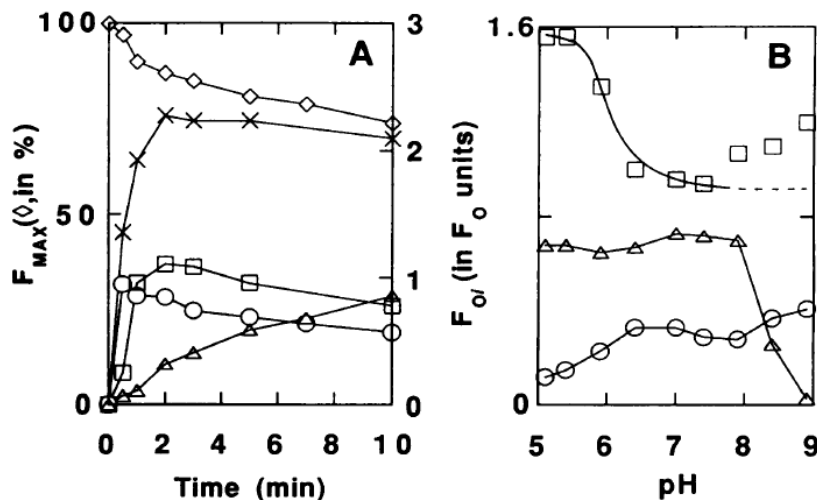


FIGURE 1.9: Etude de photoinhibition en conditions anaérobiques : (A) Evolution au cours du temps de  $F_{max}$  (losanges), de  $F_0$  (croix) et de ses différentes contributions : rapide (ronds), semistable (carrés) ainsi que stable et non décroissante (triangles), (B) dépendance de ces mêmes contributions en fonction du pH après 10 minutes de photoinhibition [27].

L'état « rapide » (figure 1.9A) se forme avant l'état métastable et subit une décroissance plus rapide. Une accumulation continue de la composante « stable et non-décroissante » au cours du temps est observée. Ces résultats sont en accord avec des réactions successives de l'état rapide à l'état stable et non-décroissant, en passant par l'état métastable. Il est également observable (figure 1.9 B) que la forme rapide est consommée plus rapidement lorsque l'acidité du milieu augmente, alors que les composantes stables et non décroissantes ainsi que métastables augmentent. Cela est cohérent avec l'hypothèse précédente, en supposant que les réactions considérées comportent un transfert de proton.

Une technique de choix pour l'analyse de ce type de système est la Résonance Paramagnétique Electronique (RPE). En effet lorsque le système étudié est une quinone, les états complètement oxydés et complètement réduits (formes respectivement de type Q et  $QH_2$ ) sont invisibles en RPE, en l'absence d'électrons célibataires. En revanche, la forme semi-réduite produit un signal RPE. Les auteurs ont donc pu attribuer, par cette technique, à la phase semi-stable la forme semi-quinone. Cette forme pouvant être réduite sous l'effet de la lumière pour donner la phase stable, celle-ci a été attribuée par les auteurs à la quinone complètement réduite et protonnée. La phase non-décroissante étant

elle-même attribuée à une déplétion<sup>2</sup> de  $Q_A$ .

Les études RPE montrent également l'apparition de  $P_{680}$  dans son état triplet en absence de dioxygène lorsque l'état non-décroissant est maintenu sous irradiation. Cela est attribué par les auteurs à la recombinaison de charges de  $P_{680}^+Pheo^-$ , comme cela avait déjà été mis en évidence dans les années 80 par Danielius et al [29].

Dans ce contexte, il apparaît que la dénaturation de la protéine D1 ne se produit qu'en présence de dioxygène. L'état triplet préalablement décrit est connu pour réagir avec le dioxygène pour former un dioxygène singulet [30]. Cela est confirmé par l'ajout de dioxygène à un système photoinhibé dans des conditions anaérobiques. Ceci provoque une extinction du signal RPE de l'état triplet de la chlorophylle. L'espèce responsable des dommages cellulaires occasionnés au cours de la photoinhibition du site accepteur est donc le dioxygène singulet, comme décrit par d'autres études plus récentes [31,32].

Ces diverses conclusions conduisent les auteurs à élaborer un mécanisme général pour la photoinhibition du site accepteur qui est reproduit en figure 1.10.

Au bilan, les mécanismes de photoinhibition, qu'ils concernent le site donneur ou le site accepteur, nuisent à l'efficacité photosynthétique. Toutefois, la photoinhibition n'est pas irréversible. Il existe, en effet, un mécanisme appelé photoréparation qui permet de restaurer l'activité photosynthétique.

### 1.2.2.3 La photoréparation

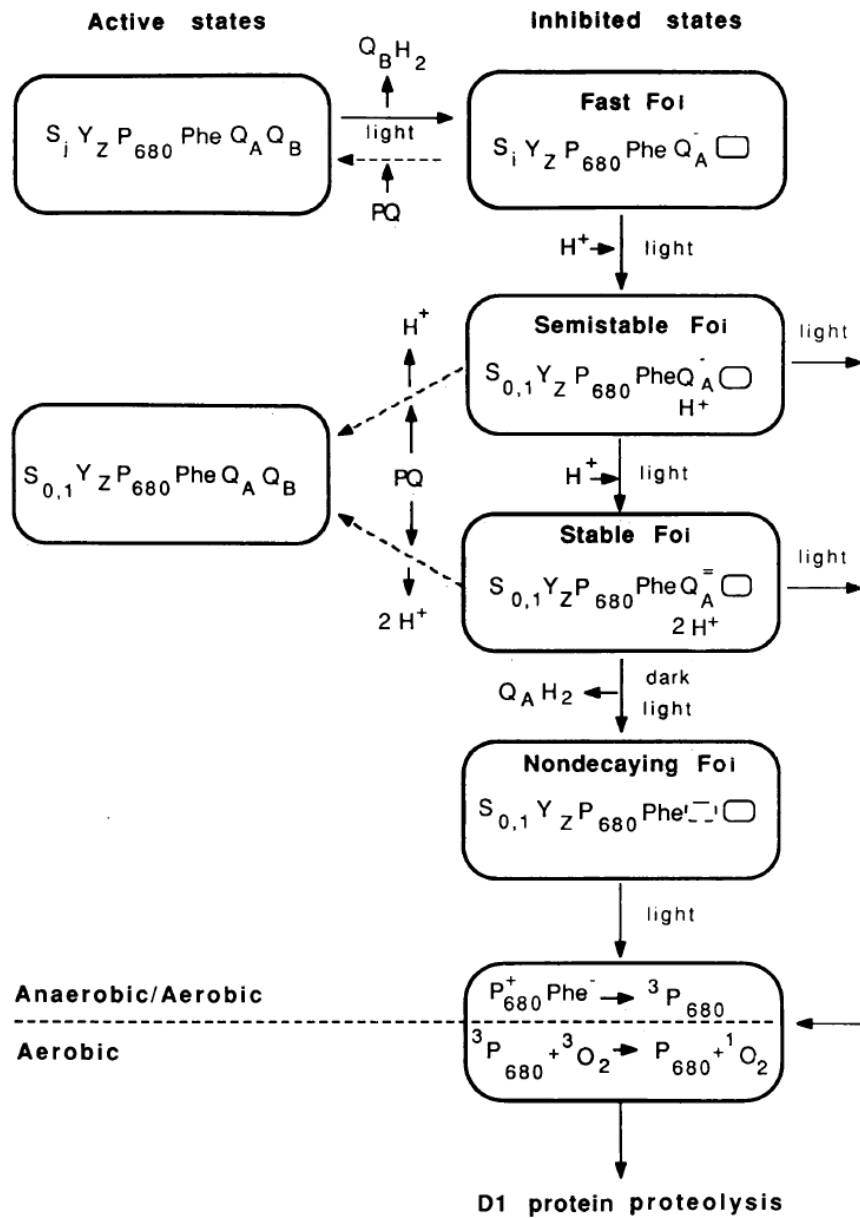
La photoinhibition, comme cela a été décrit plus haut, génère une forme inactive car endommagée de la protéine D1. Les restes de cette protéine doivent être dégradés pour permettre sa restauration. Dans cette étude, aucun commentaire ne sera fait sur la façon dont le système biologique cible spécifiquement les protéines endommagées.

De nombreuses études *in vitro* sur thylakoïdes isolés (voir la revue de Aro et al [33]), ont montré que cette dégradation s'effectuait selon un mécanisme protéolytique, à savoir un clivage enzymatique de la protéine cible en plusieurs fragments. Cela permet un désassemblage du PSII. Les fragments ainsi obtenus peuvent migrer vers la membrane exposée

---

2. Le fait que cette quinone, une fois complètement réduite, puisse quitter son site a été confirmé par la suite dans la littérature [28] par des analyses HPLC en comparant des échantillons photoinhibés ou non.





Scheme I

FIGURE 1.10: Schéma récapitulant le mécanisme de photoinhibition du site accepteur [27].

au stroma (milieu composant l'intérieur du chloroplaste, dans lequel baignent les membranes thylakoïdes), permettant la synthèse d'une nouvelle protéine, celle-ci fonctionnelle. Cette protéine retourne ensuite dans le milieu intra-grana, où elle sera fonctionnalisée. Ce processus s'effectue par une dimérisation ainsi que par la ligation avec le complexe de chlorophylle dit « antenne », communément appelé Light Harvesting Complex (LHC).

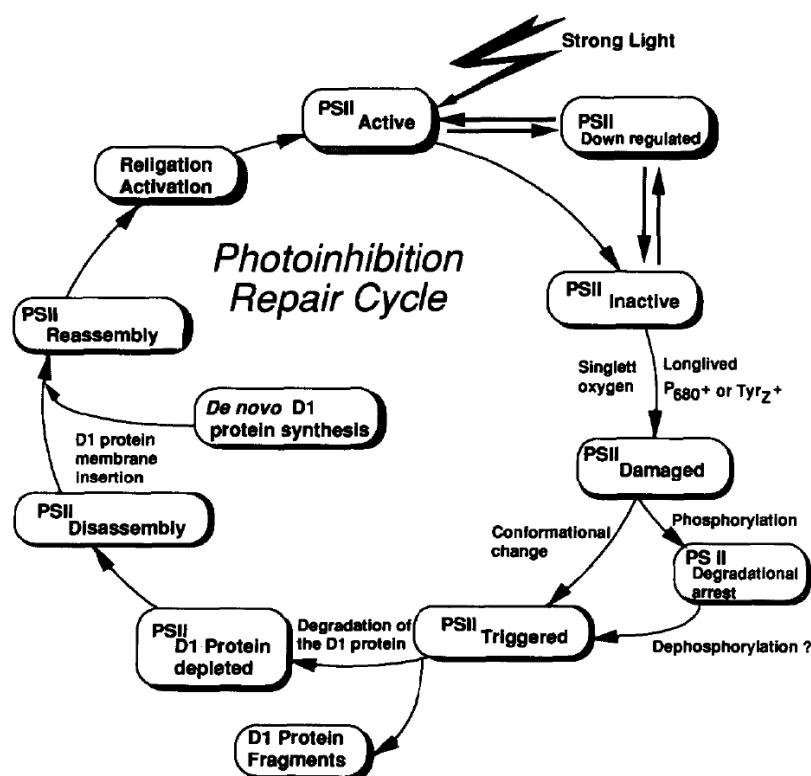


FIGURE 1.11: Schéma récapitulatif du turn-over de la protéine D1 [33].

Ce phénomène ne sera pas abordé en détails dans le cadre de cette étude bibliographique (il a néanmoins fait l'objet de nombreuses études dans les années 80-90). Globalement la protéine D1 subit un "turnover" dont la première étape est la photoinhibition (figure 1.11).

En conséquence, la photoinhibition peut donc être considérée comme une étape du processus de photoréparation, ou bien comme un phénomène distinct se déroulant avant.

#### 1.2.2.4 Photoinhibition : bilan

Le terme de photoinhibition reste finalement ambigu. Il peut en effet désigner les phénomènes microscopiques par lesquels la protéine D1 est endommagée, mais aussi l'altération de l'efficacité photosynthétique macroscopique de l'algue sous forte irradiation due à une proportion non négligeable de protéines D1 photoinhibées microscopiquement.

Quoi qu'il en soit, à faible intensité lumineuse, aucune saturation de la chaîne photosynthétique n'est obtenue. La cinétique de production d'oxygène singulet est donc faible,

et l'état  $P_{680}^{+}$  reste peu abondant. Les formations de dommages cellulaires sont alors lentes par rapport à la photoréparation. Cela a pour conséquence une faible proportion de chaînes photosynthétiques dysfonctionnelles. Il n'y aura de fait pas de photoinhibition à l'échelle macroscopique (bien que les deux types de photoinhibition à l'échelle des organites demeurent présentes).

Inversement, à forte intensité lumineuse, les concentrations en  $P_{680}^{+}$  et en oxygène singulet seront fortes. La cinétique de formation de dommages cellulaires est donc plus rapide que celle de la photoréparation. Celle-ci ne suffira donc pas à rétablir dans leur fonctionnement les chaînes photosynthétiques. La proportion de chaînes photosynthétiques dysfonctionnelles sera donc conséquente, provoquant une photoinhibition à l'échelle macroscopique.

Ces deux conditions limites sont représentées sur la figure 1.12.

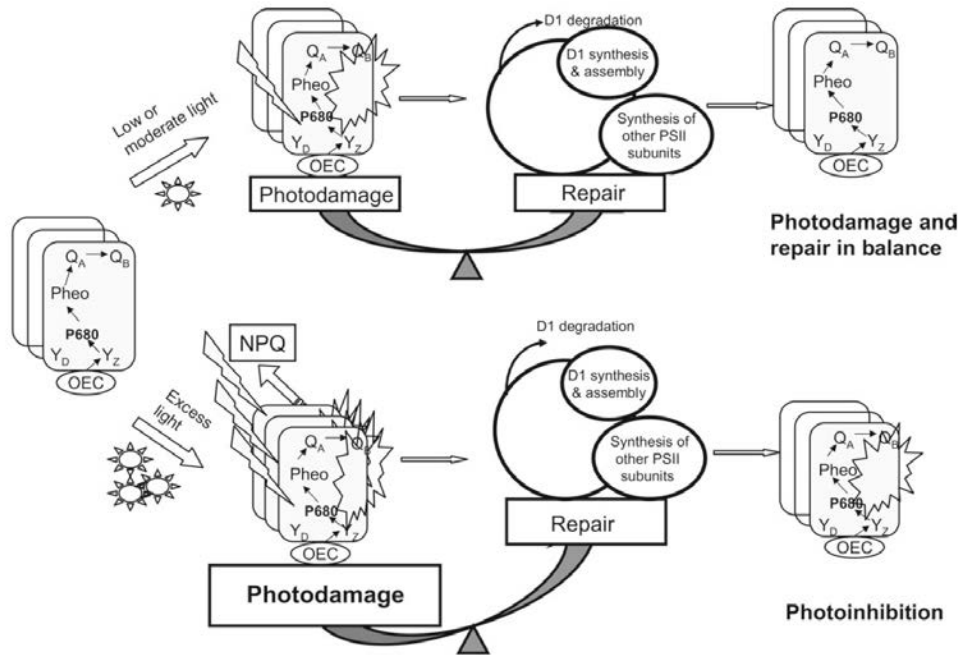


FIGURE 1.12: Schéma récapitulant les conditions de l'existence d'une photoinhibition à l'échelle macroscopique [17].

Le maintien de l'activité photosynthétique sous forte irradiation nécessite donc de lutter contre les phénomènes de photoinhibition mentionnés ci dessus.

## 1.3 Minimisation de la photoinhibition du site accepteur : les différentes approches

Comme expliqué précédemment, la photoinhibition du site accepteur est due à une trop longue durée de vie du composé  $P_{680}^{+}-Pheo^{-}$ . Pour minimiser ce phénomène, il convient donc d'accélérer les étapes en aval de la formation de ce composé dans la chaîne photosynthétique, minimisant de fait la durée de vie de ce composé<sup>3</sup>. La solution la plus simple consisterait donc à extraire directement le « surplus » d'électrons photosynthétiques par le biais d'une électrode.

### 1.3.1 Extraction directe du surplus d'électrons photosynthétiques par une électrode

La première possibilité consiste à réaliser l'extraction au plus près du site concerné. En d'autres termes, il s'agit d'approcher au maximum une électrode des sous-unités photosynthétiques afin d'interagir électrochimiquement avec celles-ci [34].

Cette stratégie peut être illustrée par le biais d'études qui consistent à insérer une électrode, nécessairement de taille nanométrique, dans un organisme photosynthétique, c'est-à-dire une cellule vivante [35].

#### 1.3.1.1 Nanoélectrodes insérées dans le chloroplaste de cellules vivantes

Le schéma de principe est représenté sur la figure 1.13, la cellule étant ici l'algue *Chlamydomonas reinhardtii*.

Une telle configuration a permis l'obtention de photocourants de l'ordre du pA (figure 1.14). L'origine photosynthétique du courant a été vérifiée via l'utilisation de DCMU, un inhibiteur de la photosynthèse déjà cité, et dont la présence empêche alors l'observation de tout photocourant.

L'approche semble donc particulièrement prometteuse. Néanmoins, des doutes subsistent en raison du caractère invasif de cette approche. En effet, si la surface de l'élec-

---

3. En effet, le fonctionnement de la chaîne photosynthétique est limitée par l'étape cinétiquement déterminante en aval de composé, comme décrit précédemment.

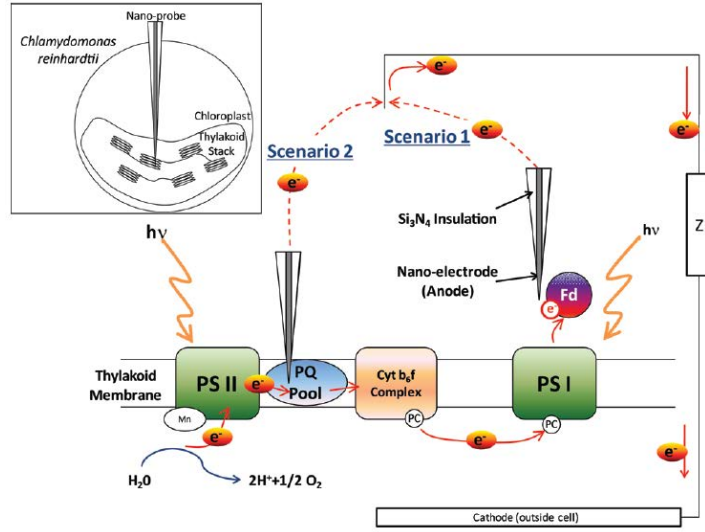


FIGURE 1.13: Schéma de principe de l'insertion de nanoélectrodes dans le chloroplaste de *Chlamydomonas reinhardtii*, en travaillant sur cellules vivantes [35].

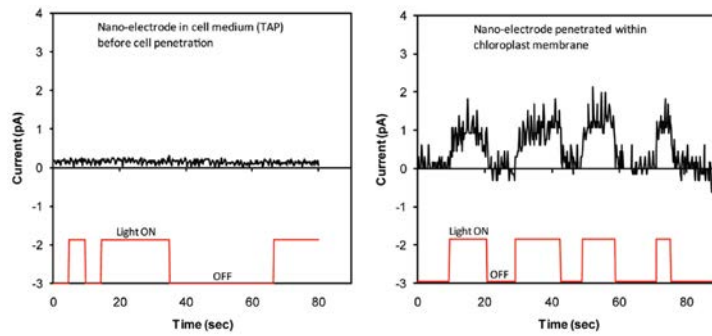


FIGURE 1.14: Courant en fonction du temps, au cours de périodes d'illumination et d'obscurité, à l'extérieur de la cellule à gauche, à l'intérieur de la cellule à droite, selon Ryu et al [35], l'électrode d'or (de diamètre inférieur à 30 nm) étant portée à un potentiel de 200 mV par rapport à une électrode de référence flottante en or.

trode est nanométrique, ce n'est pas le cas du corps de l'électrode qui, étant micrométrique, est susceptible d'endommager la cellule lors de l'insertion. De plus l'origine du courant faradique détecté n'est pas clairement attribuée, l'électrode de référence utilisée étant flottante. Cette approche est donc limitée du point de vue des applications analytiques, et est intrinsèquement inefficace du point de vue des applications préparatives (une électrode n'affectant l'efficacité du processus photosynthétique que d'une cellule, son impact tant au niveau de la réduction du  $\text{CO}_2$ , que de la génération d'un photocourant serait tout

à fait négligeable dans ce contexte). Quant à l'impact sur la prolongation de l'efficacité photosynthétique, le coté invasif de cette méthode risque d'être contre-productif (en plus de n'affecter qu'une cellule), puisque pouvant affecter la durée de vie de l'organisme lui même.

On notera que l'absence de courant lorsque l'électrode est à l'extérieur de la cellule témoigne de la nécessité d'approcher l'électrode au plus près des sous-unités photosynthétiques pour permettre un couplage électronique entre la sous-unité en question et l'électrode. Pour permettre l'observation d'un transfert d'électron direct entre la chaîne photosynthétique et l'électrode par une méthode non invasive, une solution alternative consiste donc à extraire les structures photosynthétiquement actives pour les déposer sur une électrode.

### 1.3.1.2 Membranes thylakoïdes isolées déposées sur une électrode

Cette stratégie, proposée par le groupe de Shelley Minteer [36–38], a pour principe de déposer les membranes thylakoïdes sur l'électrode afin de permettre un couplage électronique direct (figure 1.15). L'ajout de catalase, dans ce système, permet d'améliorer la stabilité du système, en éliminant le stress oxydant produit par les membranes (dû à la photoinhibition du site accepteur, telle que décrite précédemment). En irradiant ce

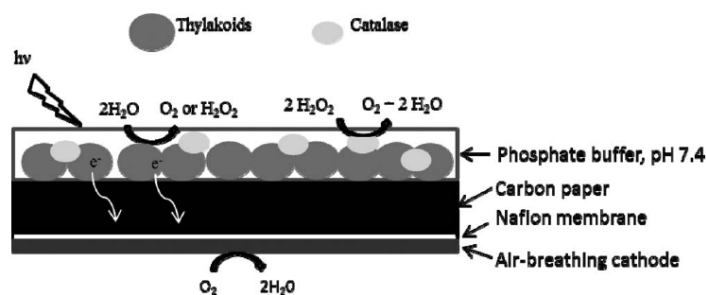


FIGURE 1.15: Schéma d'une surface d'électrode modifiée par des thylakoïdes isolés [36].

type de surface et en portant le potentiel de l'électrode à  $0,3V/ECS^4$ , des densités de photocourants de l'ordre de la centaine de  $nA.cm^{-2}$  sont observées (figure 1.16) [36]. La relative faiblesse des densités de courants obtenues rend compte de la difficulté d'un couplage électronique efficace entre l'électrode et la chaîne photosynthétique, même lorsque

4. La taille de l'électrode utilisée n'est pas précisée par les auteurs.

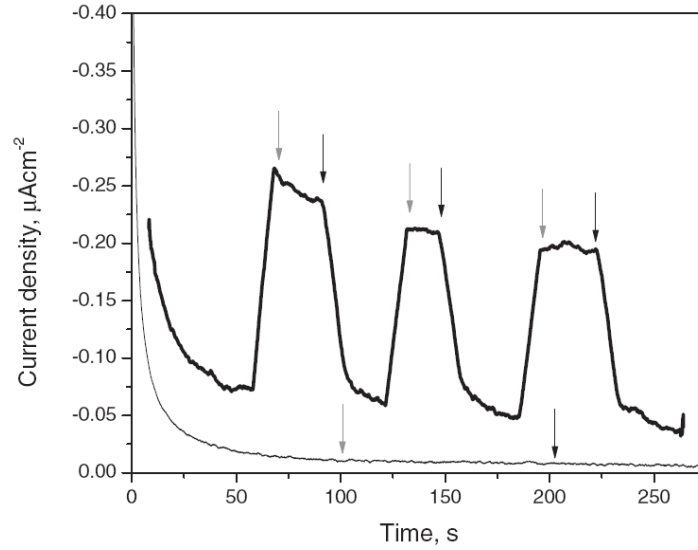


FIGURE 1.16: Densités de photocourants obtenus avec cette approche à 0,3V/ECS, les flèches grises indiquant le début des irradiations, les flèches noires la fin des irradiations [36].

les thylakoïdes sont isolés. Les densités de courants ont néanmoins été optimisées, par la suite, jusqu'à quelques microampères en couplant cette bioanode de thylakoïde à une biocathode constituée de Laccase [37].

On notera par ailleurs que cette bioanode a pu être exploitée dans une application analytique particulière nécessitant de moins grandes densités de courants à savoir des biocapteurs à herbicide [38], selon une approche déjà envisagée par Purcell et al en 1990 [39].

Toutefois, le faible ordre de grandeur des densités de courants ainsi observées semble exclure l'approche du transfert direct. L'emploi récurrent dans la littérature de médiateurs électrochimiques, via des accepteurs d'électrons du photosystème II, représente une autre piste de réflexion.

### 1.3.1.3 Stratégie du biofilm

Une autre possibilité de transférer les électrons depuis la chaîne synthétique vers une électrode consiste à constituer un biofilm à l'aide des organismes en question [40,41]. Cette approche a été publiée en 2011 en réalisant des biofilms sur des électrodes d'Indium dopé à l'oxyde d'étain (ITO) [40]. Cela a permis l'obtention de courbes de puissance, telles que celle reproduite en figure 1.17, dans le cas de biofilms constitués de *Synechococcus* sp.

WH 5701.

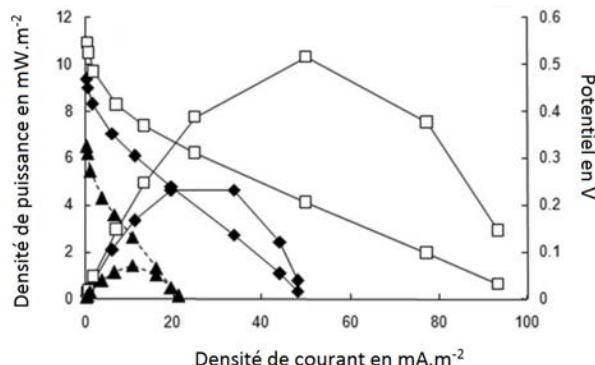


FIGURE 1.17: Exemple de courbes de puissance obtenue sur la base d'un biofilm constitué de *Synechococcus* sp. WH 5701 sur ITO [40].

Ce type d'architecture permet donc de convertir de l'énergie lumineuse en énergie électrique. Néanmoins, les phénomènes mis en oeuvre dans ce type de structures demeurent délicats à comprendre et à rationaliser. Notamment, l'origine du courant n'étant pas clairement identifiée, il est difficile de prévoir la relation entre ce type de photocourant et la photoinhibition.

### 1.3.2 Utilisation d'accepteurs du photosystème II

Des accepteurs du photosystème II, tels que des molécules de type quinone [42–59] ou  $K_3Fe(CN)_6$  [47, 49, 58, 60–65], constituent des exemples nombreux dans une littérature fournie [42–67]. Si les molécules de type quinone sont des accepteurs sélectifs du PSII, ce n'est pas le cas de  $K_3Fe(CN)_6$  qui accepte également des électrons au niveau du PSI [49]. Différentes techniques sont possibles pour étudier l'action de ces médiateurs, on citera le suivi de la production de  $O_2$  [43, 56, 58, 65], la spectroscopie Mossbauer [53]<sup>5</sup>, la RPE [42, 44, 45, 53, 60–62, 66, 67] ou encore la fluorescence [46–48, 50–52, 54, 55, 59, 63].

#### 1.3.2.1 Comparaison des efficacités des accepteurs d'électrons

Le suivi de l'efficacité d'un accepteur électronique nécessite une observable. Khorobrykh et al [68] ont montré qu'il était possible de suivre l'efficacité d'un accepteur d'élec-

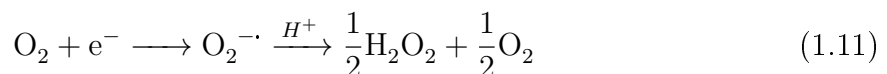
<sup>5</sup>. La spectroscopie Mossbauer permet de suivre l'état d'oxydation d'un élément, donc la dérivation électronique.



trons en suivant la réaction de consommation de  $O_2$  sur des membranes PSII (partie des membranes thylakoïdes riches en PSII et sans PSI). En effet cette réaction est composée d'une contribution du site donneur, par une réaction d' $O_2$  avec des radicaux générés par oxydation par le cation radical  $P_{680}^{+}$ , de temps de vie plus ou moins long selon les conditions expérimentales.



D'autres éléments, tels qu'une diminution de la consommation de  $O_2$  en présence d'un accepteur d'électrons exogène, témoignent [68] d'une réduction du dioxygène au niveau du site accepteur [58,68]. Cette voie a été interprétée comme correspondant à la séquence réactionnelle suivante [58] :



L'efficacité du  $K_3Fe(CN)_6$  comme accepteur électronique exogène a été comparée [58] à celle d'un autre accepteur du photosystème II, la 2,6-DCBQ. Les résultats suggèrent que la quinone est un accepteur d'électrons plus efficace que le ferricyanure, puisqu'elle permet de diminuer davantage la photoconsommation d' $O_2$ .

Ce résultat a en outre été confirmé par Shevela et al [56], via des mesures de  $O_2$  marqué isotopiquement comme étant issus de l'oxydation de l'eau par spectrométrie de masse, sur des fragments de membrane PSII. Les deux mêmes accepteurs que précédemment ainsi qu'une autre quinone, la Phényl-para-Benzoquinone (PPBQ), sont comparés. Une série de 10 flashes lumineux est réalisée, à des fréquences comprises entre 2 et 50 Hz. Aucune influence de la fréquence des flashes ne semble être observée dans le cas de la PPBQ, signe que l'évolution maximale est atteinte. Dans le cas de la 2,5-Dichlorobenzoquinone (2,5-DCBQ), à 2 Hz, le comportement est similaire à celui de la PPBQ mais une baisse de l'apparition de dioxygène marqué est observée lorsque la fréquence des flashes augmente. Cela signifie que la dérivation électronique est plus lente dans ce cas et que l'ensemble des électrons ne peut plus être dévié lorsque la fréquence des flashes lumineux devient trop grande. Dans le cas du ferricyanure, une moins bonne efficacité est observée dès la fréquence de 2 Hz, ceci diminuant encore avec la fréquence des flashes. Il a été montré par ailleurs [69] que l'activité maximale n'est atteinte que pour des fréquences de 0,3 à 0,5 Hz dans le cas de ce composé.

La PPBQ semble donc plus efficace que la 2,6-Dichlorobenzoquinone (2,6-DCBQ), ces deux quinones étant elles mêmes plus efficaces que le ferricyanure. Toutefois, des résultats en apparence contradictoires existent [70]. Ceci impose alors de ne pas prendre ces échelles de comparaison pour acquises et donc nécessite de recomparer les efficacités des médiateurs envisagés sur l'entité biologique étudiée par la suite dans cette thèse.

### 1.3.2.2 Aspects mécanistiques

#### 1.3.2.2.1 Cas du ferricyanure

Afin d'interpréter la différence de comportements des différents médiateurs, le premier aspect mécanistique à identifier consiste à savoir à quel point de la chaîne photosynthétique le médiateur intervient.

Le ferricyanure est connu dans la littérature comme pouvant oxyder  $Q_A^-$ , y compris en présence de DCMU, lui-même connu pour inhiber le transfert d'électrons de  $Q_A$  à  $Q_B$ . En effet, Itoh [71] a montré par fluorescence que l'ajout de  $K_3Fe(CN)_6$  permettait d'oxyder l'espèce  $Q_A^-$ .

L'action de ce composé se situe donc en amont de  $Q_B$ . Dans un premier temps, deux hypothèses ont été envisagées dans la littérature. La première d'entre elles correspond à l'oxydation directe de  $Q_A^-$  par le ferricyanure [71]. La deuxième consiste en une oxydation de l'oxydant endogène de  $Q_A^-$  noté  $A_H$ , accélérant de fait son oxydation [72].

La discrimination entre ces deux mécanismes a fait l'objet de publications contradictoires dans la littérature. L'hypothèse d'une oxydation directe de  $Q_A^-$  par le ferricyanure est soutenue par des études RPE [62] permettant de suivre indirectement l'état d'oxydation de  $Q_A^-$ . En présence de DCMU, cela revient à étudier la capacité d'un accepteur d'électrons à oxyder  $Q_A^-$ . Les auteurs montrent ainsi que la cinétique de cette réaction est d'ordre 1, ce qui est en accord avec une oxydation directe.

Cette conclusion est remise en cause par le fait qu'il existe un accepteur endogène potentiel de  $Q_A^-$  avant le blocage par DCMU [73]. Cet accepteur a par ailleurs été identifié comme étant le fer lié à  $Q_A$  [74]. Des études de spectroscopie Mössbauer ont montré que le ferricyanure oxydait cet atome de Fer [74]. Ceci ne serait pas le cas si l'oxydation de  $Q_A^-$  se faisait d'une manière directe, le fer attaché à la quinone resterait alors sous sa forme

réduite. Ces observations ont été confirmées par d'autres études spectroscopiques [53]. Le fait que les deux mécanismes (oxydations directe et indirecte) correspondent à des cinétiques du même ordre explique la confusion.

### 1.3.2.2.2 Cas des quinones

Le mécanisme d'oxydation des accepteurs endogènes du PSII ( $Q_A$ , Fe,  $Q_B$ ...) par ces composés a été abondamment étudié, fournissant de fait une littérature relativement variée et abondante [42, 45–47, 50, 56, 75].

En absence de lumière, l'ajout de PPBQ conduit à l'apparition de faibles signaux RPE attribués au  $Fe^{3+}$ , qui disparaissent lors d'une illumination de 20 minutes à 77 K. Une incubation à 18°C provoque la réapparition de ces signaux, avec une intensité nettement plus importante. En absence de quinone, ces signaux sont absents quelles que soient les conditions. L'apparition du  $Fe^{3+}$  est donc bien due à une oxydation chimique par la quinone, qui est plus importante si l'échantillon a subi une irradiation préalable. L'irradiation conduit à l'apparition d'autres signaux attribués à  $Q_A-Fe$ . Ces signaux sont complètement éliminés par une incubation en présence de quinone, ce qui est le signe d'une oxydation de  $Q_A^-$  par la quinone exogène. Dans le contrôle (en absence de quinone), ces signaux sont encore visibles, bien que modifiés. Cette évolution est attribuée au transfert électronique entre  $Q_A^-$  et  $Q_B$ .

Ces résultats impliquent donc la nécessité de la présence de  $Q_A-Fe$  pour l'oxydation du fer par la quinone exogène. Ceci indique que l'oxydation du fer est due à la semi-quinone exogène, issue de l'oxydation de  $Q_A^-$ , ou d'une plastoquinone elle-même réduite par  $Q_A^-$  dans le site  $Q_B$ . Si l'électron provient directement de  $Q_A^-$ , le transfert se fait via une utilisation du site  $Q_B$  par la quinone exogène. En effet, l'ajout d'inhibiteurs connus pour se fixer dans le site  $Q_B$  inhibe ces réactions [45]. L'apparition d'un faible signal du  $Fe^{3+}$  lorsque les membranes sont conservées à l'obscurité est interprétée comme étant due à la présence d'un peu de  $Q_A-Fe$  dans de telles membranes.

Cela a été confirmé par ailleurs lors d'expériences utilisant une série de flash lumineux séparés par des périodes d'obscurité. Le mécanisme précédant explique ce comportement. En effet, un photon est requis pour réduire  $Q_A$ . Dès lors, la quinone exogène va l'oxyder,

généralisant une semi-quinone instable qui va oxyder le Fer. Ce photon va donc provoquer l'oxydation du fer, le photon suivant provoquant de fait sa réduction. Ce comportement oscillant a été confirmé ultérieurement dans la littérature [46].

Ce caractère rédox oscillant de l'atome de fer a également été observé dans le cas d'autres quinones comme Benzoquinone (BQ) et 2,5-Diméthylbenzoquinone (2,5-DMBQ), mais pas dans le cas de la 2,5-DCBQ [75]. Concernant la capacité de plusieurs quinones à oxyder le fer, il apparaît que la PPBQ est la plus efficace, suivie des 2,5-DMBQ et BQ. Comme les plastoquinones endogènes, la 2,5-DCBQ ne provoque pas d'oxydation de l'atome de fer. Pourtant, comme il a été dit précédemment (Comparaison des efficacités des accepteurs d'électrons), il s'agit d'un accepteur connu du photosystème II, qui doit donc agir par un autre mécanisme.

Toutefois une étude concernant la cinétique de réduction de la chaîne photosynthétique observée par fluorescence [50] tend à montrer une similitude de comportement entre les PPBQ et la 2,5-DCBQ, à la différence de dérivés méthylés autres que les DMBQ non étudiés dans cet article. Les auteurs en déduisent que ces deux composés agissent via une affinité pour la poche  $Q_B$ . Il est possible que la différence de mécanisme décrite précédemment ne se traduise pas par une différence significative de cinétique de réduction de la chaîne photosynthétique. En effet la PPBQ va accepter des électrons issus de  $Q_A$  directement, ou indirectement via une plastoquinone réduite, puis de l'atome de fer. La 2,5-DCBQ va, quant à elle, accepter les électrons provenant de  $Q_A$  grâce au même site de fixation  $Q_B$ . Cela peut s'effectuer soit via un transfert de deux électrons successifs permettant sa réduction complète, soit par un transfert d'un seul électron conduisant à sa libération, permettant sa semi-régénération catalytique via une réaction de dismutation. Les deux mécanismes se traduisent donc par une oxydation des membranes thylakoïdes dans la même « zone photosynthétique », ce qui peut expliquer que cette étude ne permette pas d'observer de différence mécanistique significative entre ces deux types de molécules.

#### **1.3.2.2.3 Quels accepteurs choisir ?**

La complexité et la diversité des mécanismes d'action des accepteurs du PSII rend difficile l'élaboration d'un « classement » définitif. Ceci conduit alors à un choix empirique

qui aboutit souvent à une comparaison a posteriori, qui dépend du système considéré.

Quoi qu'il en soit, l'utilisation de ces accepteurs constitue une approche crédible de l'extraction des électrons photosynthétiques. En effet, la consommation de ces accepteurs électroniques permet de créer une voie de conversion de l'énergie lumineuse en énergie électrique, via un transfert d'électron médié.

### **1.3.2.3 Transfert d'électrons photosynthétiques médié**

Le principe du transfert d'électron médié consiste à utiliser un accepteur électronique sous sa forme oxydée  $M_{ox}$  et qui va être converti en sa forme réduite  $M_{red}$  en récupérant les électrons. Il s'agit ensuite de chercher à réoxyder électrochimiquement ces molécules ainsi réduites, pouvant permettre de fait, une pérennisation du système dans le temps.

Par ailleurs, la difficulté à évaluer la capacité intrinsèque d'un accepteur à récupérer les électrons photosynthétiques permet finalement de ne pas se limiter aux accepteurs « classiques » du PSII, comme nous le verrons dans certaines études.

Enfin, lorsqu'un travail sur cellules vivantes est effectué, l'accepteur d'électrons doit traverser un grand nombre de membranes avant d'accéder aux sous-unités photosynthétiques qu'il va pouvoir oxyder, ce qui est susceptible de limiter son action. C'est pourquoi certaines approches sont consacrées à des études sur thylakoïde isolé, voire sur photosystème isolé.

#### **1.3.2.3.1 Electrodes modifiées par des centres catalytiques pour transfert d'électron médié**

Le but de cette étude est de montrer qu'il est possible de récupérer électrochimiquement les électrons issus du PSII. C'est pourquoi nous nous intéresserons dans un premier temps aux bioanodes utilisant ce centre catalytique. Néanmoins, il est intéressant de considérer que ces études ayant été réalisées dans un but énergétique, le couplage avec une biocathode efficace (dont de nombreux exemples utilisant le photosystème I sont présents dans la littérature) représente également un enjeu majeur, ce qui sera présenté par la suite.

### 1.3.2.3.1.1 Réalisation de bioanodes

De nombreuses publications utilisent ce type de stratégie avec un accepteur électronique également immobilisé sur la surface (voir la revue de Ran Tel-Vered et Itamar Willner [76]). Une grande partie de ces travaux concernent des centres PSI [77–85], ce qui ne sera pas détaillé ici, où nous nous limiterons au PSII.

Plusieurs études de ce type sont présentes dans la littérature [86–88]. Nous pouvons prendre l'exemple du travail réalisé par le groupe de Wolfgang Schuhmann [86]. Dans cette approche, représentée sur la figure 1.18, des centres photosystème II, sont immobilisés à la surface de l'électrode dans un gel de polymères marqués à leur extrémité libre par l'accepteur d'électron exogène, ici un complexe d'osmium [86].

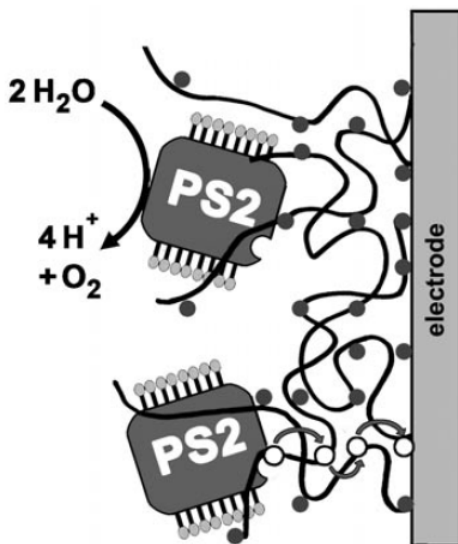


FIGURE 1.18: Schéma de principe d'une surface sur laquelle des centres PSII sont immobilisés au sein d'un polymère conducteur modifié par des complexes d'osmium servant d'accepteur électronique. [86]

Cette approche a permis l'obtention de densités de courants (figure 1.19) significatives<sup>6</sup>.

Une autre manière de procéder consiste à utiliser un accepteur d'électrons en solution,

---

6. Ces auteurs travaillant dans un but énergétique, la réalisation d'une biopile nécessite une bioanode et une biocathode. Ils ont donc suivi une approche similaire en immobilisant par la même voie des photosytèmes I, obtenant un courant de réduction [77]

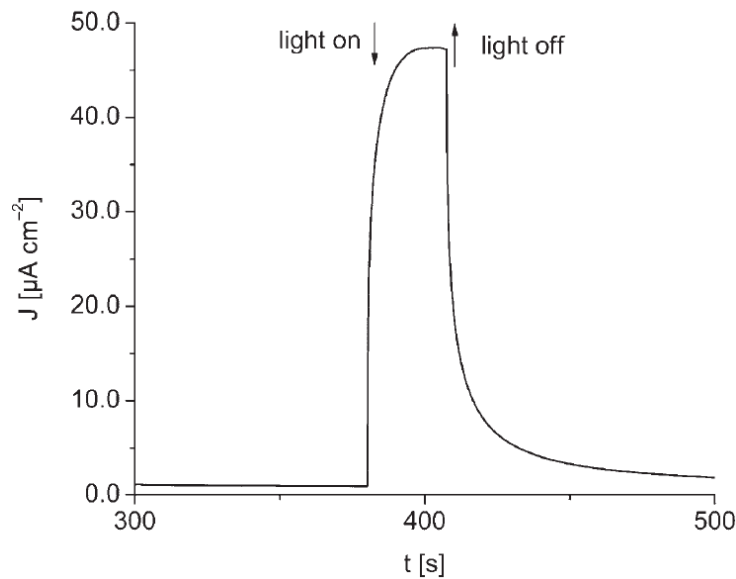


FIGURE 1.19: Densité de courant en fonction du temps suite à une illumination du système à une longueur d'onde de 675 nm, à  $2,65 \text{ mW.cm}^{-2}$ , le potentiel appliqué étant de 300 mV/Ag/AgCl [86], sur une électrode d'or de 2 mm de diamètre.

une quinone par exemple. Plusieurs études de ce genre figurent dans la littérature [89–91]. Ainsi pourra être cité l'exemple d'une bioanode réalisée en immobilisant des centres PSII à la surface de l'électrode en présence de 2,6-DCBQ [91]. Les photocourants ainsi générés sont représentés sur la figure 1.20.

L'étude de la bioanode donne des photocourants (figure 1.20) significatifs et stables sur la durée de l'expérience, de l'ordre de la dizaine de secondes. La faible durée de l'expérience présentée ici nécessite toutefois de relativiser la stabilité obtenue.

Il existe néanmoins, selon cette même stratégie, des architectures de bioanodes bien plus complexes. Le groupe de Tel-Vered a notamment réalisé des bioanodes en immobilisant des PSI et des PSII sur la même électrode [84,92] (figure 1.21). On pourra prendre l'exemple de ce type d'architecture, qui donne des densités de photocourants de l'ordre de quelques centaines de  $\text{nA.cm}^{-2}$ , décroissantes sur quelques dizaines de secondes.

Ce type d'approche, plus complexe, semble donc moins efficace que celles employant des architectures plus simples, tant en terme d'efficacité que de stabilité.

Les architectures ici présentées permettent donc la réalisation de bioanodes. Cependant, lors d'applications énergétiques, une anode nécessite d'être couplée à une cathode.

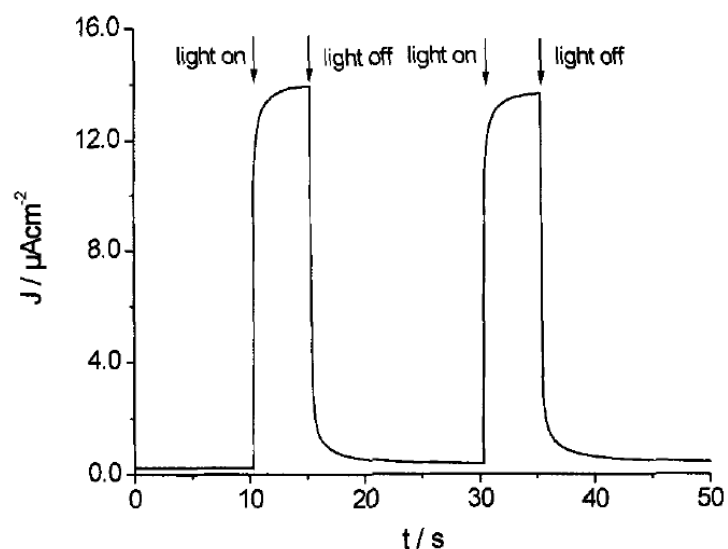


FIGURE 1.20: Densité de courant en fonction du temps, au fil de pulses successifs de lumière à  $100 \mu\text{mol de photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ , de longueur d'onde 675 nm, à une concentration de 2,6-DCBQ de 1 mM, et à un potentiel de 0,3 V/Ag/AgCl [91].

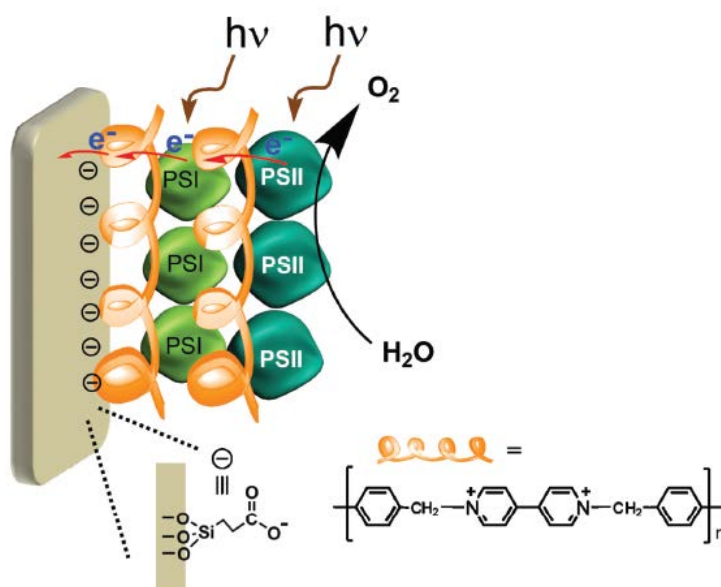


FIGURE 1.21: Schéma d'une électrode d'ITO modifiée par des centres PSI et PSII au sein d'une matrice de polymère conducteurs. [84]

#### 1.3.2.3.1.2 Réalisation de biopiles photosynthétiques

La combinaison d'une biocathode et d'une bioanode peut s'envisager selon différentes approches. L'une d'entre elles consiste à utiliser les deux photosystèmes I et II pour réaliser



respectivement les bioanodes et biocathodes. Cela a été réalisé par le groupe de Wolfgang Schuhmann qui a appliqué ses travaux précédents concernant l'immobilisation de PSII et de PSI dans des polymères d'osmium [77, 86] à la réalisation d'une biopile (figure 1.22).

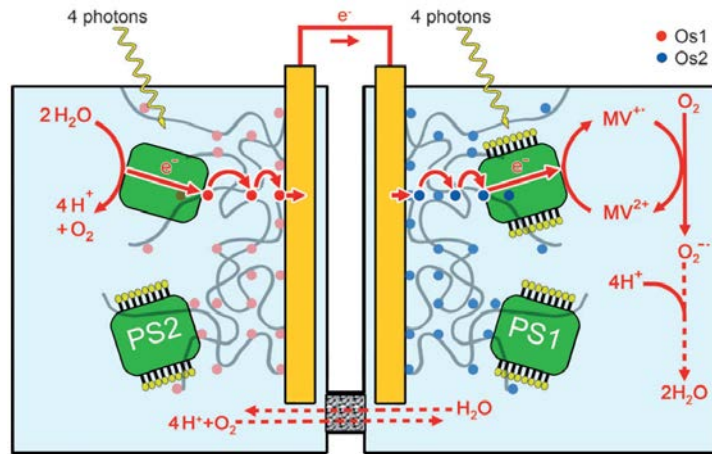


FIGURE 1.22: Schéma de principe d'une biopile constituée de centres PSI et PSII respectivement à la cathode et à l'anode au sein de polymères d'osmium [93].

Cette biopile a permis l'obtention de photocourants de l'ordre du  $\mu\text{A.cm}^{-2}$  stables sur des durées de l'ordre de quelques dizaines de secondes.

Une autre possibilité consiste à utiliser des PSII comme un pont de transferts électroniques de l'anode à la cathode. Un exemple de ce type d'approche a été développé dans le groupe de Tel-Vered [88] et se trouve schématisé sur la figure 1.23.

Le principe de l'anode consiste à modifier une électrode d'or par un polymère à base de quinones, sur lequel des centres PSII sont déposés. Un agent réticulant (Bis[sulfosuccinimidyl] suberate (bs3)) est ajouté. La cathode est constituée d'une électrode de carbone vitreux modifiée par des nanotubes de carbone. Ces nanotubes sont porteurs d'une enzyme, la bilirubine oxydase, qui catalyse la réduction du dioxygène. Un transfert d'électron direct de l'électrode carbone/nanotubes de carbones vers l'enzyme est possible.

Ce type d'architecture permet de générer une puissance électrique, dont l'évolution en fonction de l'intensité délivrée est donnée en figure 1.24. Cela témoigne d'une intensité de débit optimale d'environ  $60 \mu\text{A.cm}^{-2}$ , permettant l'obtention d'une densité de puissance d'environ  $17 \mu\text{W.cm}^{-2}$ . Le rendement quantique obtenu par cette stratégie est de l'ordre de 1%. Cependant, il est à noter qu'aucune information relative à la stabilité du photocourant ainsi obtenu n'est fournie dans cette étude.

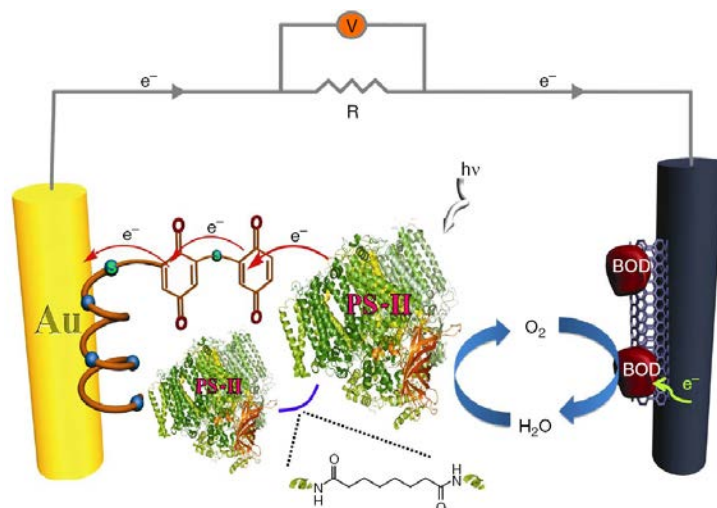


FIGURE 1.23: Schéma de l'utilisation de centres PSII comme ponts entre l'anode et la cathode dans le cadre d'une biopile [88].

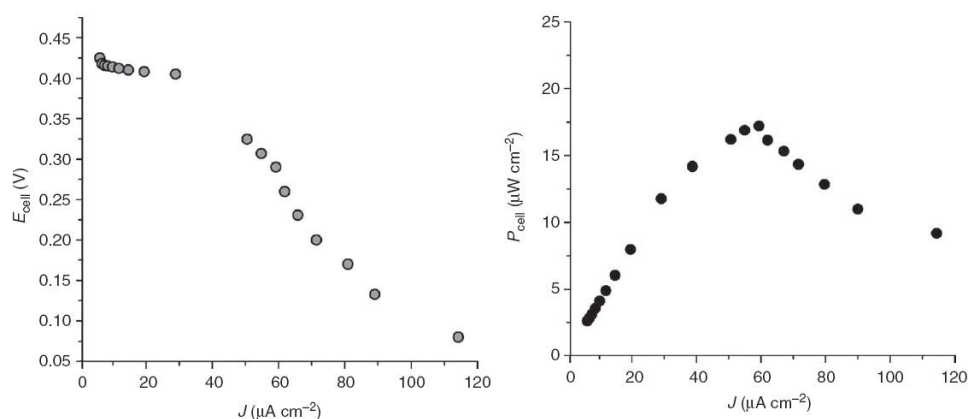


FIGURE 1.24: Courbe de polarisation ( $E=f(J)$ ) à gauche et dépendance de la densité de puissance émise en fonction de la densité de courant émis (à droite) par une biopile de type poly(mercaptop-benzoquinone)/PSII/bilirubin oxydase/ nanotubes de carbones/carbone[83], Puissance incidente de 0,1 W, longueur d'onde supérieure à 400 nm [88].

Cette même logique de modification de surface par des éléments extraits d'organismes photosynthétiques peut également être employée à d'autres échelles.

### 1.3.2.3.2 Membranes thylakoïdes déposées sur des électrodes pour transfert d'électron médié

Il est également possible de travailler en transfert d'électron médié en déposant sur

l'électrode, non pas des photosystèmes isolés mais des thylakoïdes isolés [94] (figure 1.25). Il s'agit donc de la même logique d'extraction d'entité biologique qui est déposée sur une électrode, mais à une échelle plus importante.

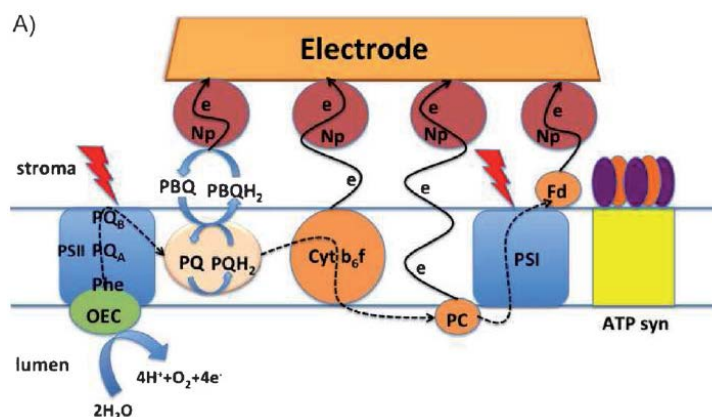


FIGURE 1.25: Schéma de l'approche d'un transfert d'électrons médié entre une membrane thylakoïde adsorbée et une électrode modifiée par des nanoparticules d'or [94].

Cette approche se base sur la possibilité d'une interaction entre le pool de plastoquinones et une quinone exogène. Le transfert d'électrons de la quinone vers l'électrode est alors facilité par la présence de nanoparticules d'or, qui de par leur faible taille, permettent probablement un meilleur couplage électronique avec la chaîne photosynthétique<sup>7</sup>.

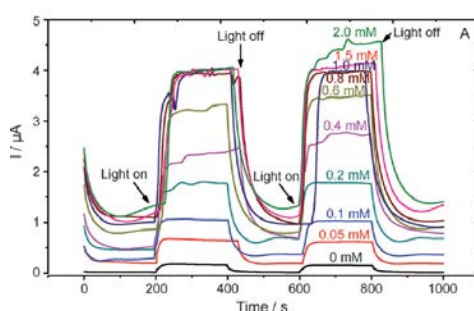


FIGURE 1.26: Courant en fonction du temps au cours de deux pulses successifs de lumière à une intensité lumineuse de  $680 \text{ mW.cm}^{-2}$ , à un potentiel de  $400 \text{ mV/Ag/AgCl}$  pour différentes concentrations de benzoquinone, avec une électrode d'une surface géométrique de  $0,02 \text{ cm}^2$  [94].

Le courant semble relativement stable sur une échelle de temps de l'ordre de la centaine

7. Ce travail de communication électrochimique entre une membrane thylakoïde et une électrode s'inscrit dans une lignée de travaux de ce groupe consistant à développer la communication électrochimique entre une entité biologique et une électrode modifiée [95–97].

de secondes d'illumination, et pour des temps d'incubation préalable de l'ordre de quelques centaines de secondes (figure 1.26). Les courants obtenus sont de l'ordre de quelques microampères, soit des densités de courant de l'ordre de la centaine de  $\mu A.cm^{-2}$ .

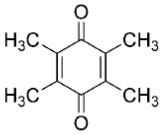
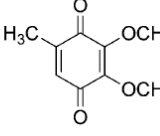
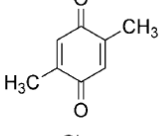
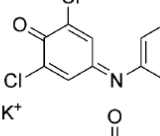
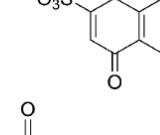
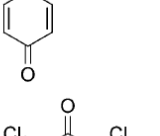
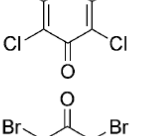
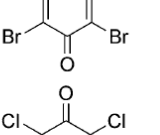
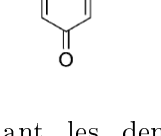
Quinone	Structure	$E_{1/2}$ [mV]	$J$ [ $\mu A.cm^{-2}$ ]
duroquinone		-145.0	$7.0 \pm 0.1$
2,3-DMO-5-M-PBQ		-20	$31 \pm 2.16$
2,5-DM-PBQ		-15.0	$13.27 \pm 0.2$
DCIP		+23.0	$4.47 \pm 0.40$
naphthoquinone		+24.0	$20.21 \pm 0.71$
PBQ		+100	$127 \pm 4.43$
tetrachloro-PBQ		+131	$30 \pm 0.88$
tetrabromo-PBQ		+135	$23.18 \pm 0.34$
DCBQ		+150	$122 \pm 9.13$

FIGURE 1.27: Tableau récapitulatif des densités de courant maximale mesurées à 400 mV/Ag/AgCl, concentration de quinone égale à 600  $\mu M$ , intensité lumineuse de 680  $W.cm^{-2}$  selon Gorton et al [94].

Dans ce contexte, l'influence de la nature chimique du médiateur a également été étudiée (figure 1.27) [94]. Les meilleurs semblent être la benzoquinone et 2,6-DCBQ. Les

autres composés présentent un courant plus faible, ce que les auteurs attribuent à un potentiel standard trop faible (pour les composés de la duroquinone à la naphthoquinone, soit à un problème de solubilité des molécules dans la solution physiologique pour les tetrabromo et tetrachloro quinones).

Le même genre d'études a pu être réalisé avec un autre accepteur électronique : le ferrocyanure par le groupe de Jessica Calkins [98] qui a déposé des membranes thylakoïdes sur des électrodes d'or modifiées par des nanotubes de carbone. En présence de ferricyanure, un photocourant d'oxydation est généré (figure 1.28). Dans ces conditions, une modification du potentiel de circuit ouvert est observée et une analyse d'impédance a pu être réalisée.

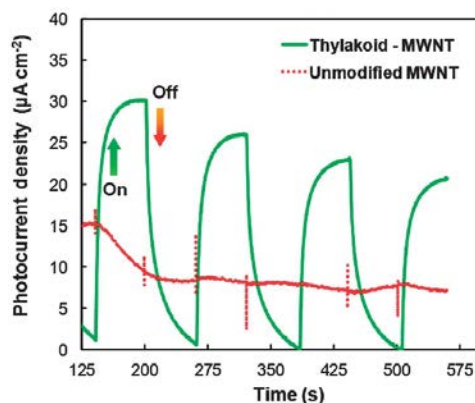


FIGURE 1.28: Densités de photocourants obtenus sur une électrode d'or modifiée par des nanotubes de carbone et des membranes thylakoïdes en présence  $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$  1,5 mM, l'électrode (de  $0,02 \text{ cm}^2$ ) étant portée à un potentiel de 0,2 V vs Ag/AgCl [98].

L'origine photosynthétique des courants obtenus a été confirmée en observant l'inhibition de ces courants par le DCMU. L'irradiation d'une telle architecture permet l'obtention de photocourants d'oxydation (voir ci-dessus) dont la densité est de l'ordre de quelques dizaines de  $\mu\text{A.cm}^{-2}$ . La faible durée de chaque cycle on-off (5 secondes) ne permet pas de commenter la stabilité du système au cours d'un cycle. Néanmoins, les photocourants sont décroissants au fil des cycles<sup>8</sup>.

8. Les auteurs ont également mesuré l'évolution du potentiel de circuit ouvert au cours des cycles. Si une influence de la lumière est effectivement constatée, celle-ci n'est pas davantage commentée par les auteurs. Au vu de la complexité du système, et de certaines données manquantes, cette expérience ne sera donc ni présentée ni commentée ici.

Il est donc possible d'extraire des électrons depuis un centre photosynthétique, ou depuis des membranes thylakoïdes vers une électrode, par le biais d'un transfert d'électrons médié. Cela laisse à penser que l'on peut préserver l'activité photosynthétique sous forte irradiation d'une unité photosynthétique en fonctionnement. Cependant, les unités biologiques extraites de leur environnement ont un temps de vie limité. L'absence de la machinerie cellulaire environnante exclut tout auto-renouvellement de ces unités, ce qui pose problème dans le cadre d'applications énergétiques, qui constituent le contexte de ces études. Il est donc nécessaire d'envisager des études sur cellule photosynthétique dans sa globalité, malgré les difficultés que cela va inmanquablement engendrer (membranes supplémentaires à traverser... etc).

### 1.3.2.3.3 Transfert d'électron médié sur cellules vivantes immobilisées

Ce type de système a été envisagé par le groupe de Lo Gorton [99]. Des électrodes de carbone sont modifiées par des polymères conducteurs d'Osmium. Puis des bactéries photosynthétiques (*Rhodobacter Capsulatus*) y sont immobilisées. Dès lors, les expériences sont réalisées en présence ou non de benzoquinone. Un schéma récapitulatif du système étudié, ainsi que des différents transferts d'électrons envisageables est donné en figure 1.29. Plusieurs types de transferts d'électrons sont alors susceptibles de se produire, à savoir

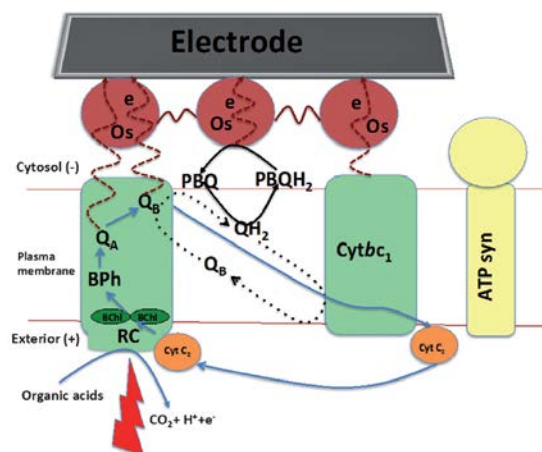


FIGURE 1.29: Schéma de l'extraction de photocourants de *Rhodobacter Capsulatus* décrite par Gorton et al, les cercles rouges représentant les polymères d'Osmium, et les traits rouges pointillés des transferts d'électrons envisageables [99].

des transferts d'électrons directs ou bien médiés par de la benzoquinone. Les principaux résultats sont représentés en figure 1.30. Ils mettent en évidence le transfert d'électron direct entre les cellules et la surface de l'électrode (courbe noire). Néanmoins, le courant est augmenté en présence du polymère d'Osmium (courbe rouge) et à plus forte raison lorsque de la benzoquinone est présente dans le milieu (courbe bleue).

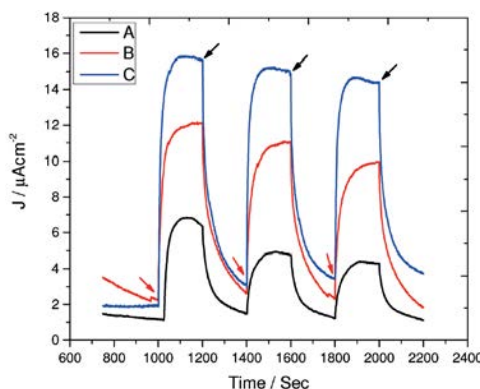


FIGURE 1.30: Mesure de photocourants réalisés en déposant *Rhodobacter capsulatus* sur une électrode de carbone nue (3,05 mm) (A), modifiée par le polymère d'osmium Os-BPPVI (B) ou sur la même électrode de carbone modifiée en présence de benzoquinone (0,6 mM)(C) [99].

Ce travail témoigne du fait que bien que, selon les conditions (organismes photosynthétiques, nature de la surface de l'électrode...), un transfert d'électron direct puisse avoir lieu, la présence d'un médiateur exogène facilite la communication électronique entre la cellule et l'électrode. Il est à noter la valeur extrêmement élevée de la concentration de benzoquinone employée (plusieurs centaines de  $\mu\text{mol.L}^{-1}$ ).

On notera également que les bactéries sont immobilisées sur la surface de l'électrode via l'application d'une pression, ce qui a plusieurs conséquences. En effet, on peut se demander si l'électrode de carbone est réellement nue ou si l'application de cette pression sur une suspension de bactéries aurait pu créer un film (biofilm ou non) sur la surface de l'électrode. La question du maintien de l'intégrité physiologique des bactéries après un tel traitement mérite d'être posée. Cette question paraît intuitivement moins cruciale si une suspension de cellules est utilisée.

### 1.3.2.3.4 Transfert d'électron médié sur cellules vivantes en suspension

La cinétique de dérivation électronique par les quinones peut être aisément suivie par détection électrochimique, en particulier dans une logique non préparative [100,101]. Ainsi les benzoquinone, diméthylbenzoquinone et dichlorobenzoquinone ont été étudiées comme accepteurs d'électrons en présence d'une population de *Synechococcus* (cyanobactéries unicellulaires) ou *Rhodobacter*. La détection est effectuée sur électrode tournante au potentiel d'oxydation de la forme réduite de la benzoquinone. Des photocourants ont pu être obtenus, voir figure 1.31.

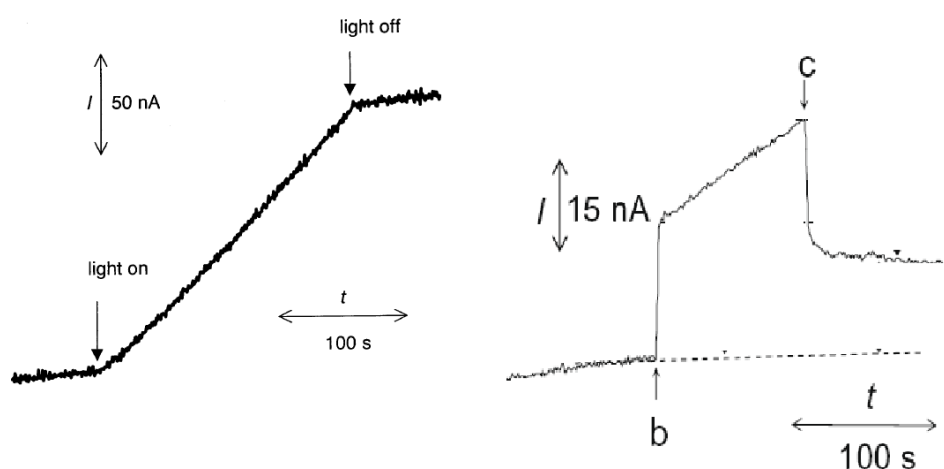


FIGURE 1.31: Photocourants obtenus suite à l'exposition de *Synechococcus* à 100 mM de BQ dans une solution de pH 8, sous illumination à  $150 \mu\text{mol.s}^{-1}.\text{m}^{-2}$  en présence d'une électrode tournante de carbone portée à 0,6 V/Ag/AgCl [101](gauche), ou de *Rhodobacter Sphaeroides* exposés à 100 mM de dichlorobenzoquinone en milieu tampon pH 8, la vitesse de rotation de l'électrode est de 1500 rpm et le flux de photons est de  $1000 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  [100]. (à droite)

La pente nettement plus forte enregistrée aux temps très courts dans le cas du *rhodobacter* est attribuée à une adsorption des cellules sur la surface de l'électrode. Ces photocourants permettent de calculer une vitesse de photoréduction de la quinone, qui peut être tracée en fonction de différents paramètres tels que le flux de photons incident ou la concentration en quinone. Ceci peut permettre [101] d'étudier des caractéristiques telles que la nature de l'étape cinétiquement limitante (activation/ diffusion...).

L'outil ainsi développé est donc d'ordre purement analytique. Dans ces conditions,



l'électrode n'affecte pas l'ensemble du volume de la solution. Ce système ne permet donc pas de maintenir l'efficacité photosynthétique sous des conditions de forte irradiation, ce qui n'est pas son objectif initial il est vrai.

Pour permettre à un transfert d'électron médié sur cellule vivante d'interagir sur l'ensemble du volume, il convient d'augmenter le ratio de la surface de l'électrode sur le volume de l'échantillon. Une possibilité consiste ainsi à approcher une UME très proche d'une cellule toujours en présence d'un accepteur d'électrons exogène. C'est l'approche développée par Yasukawa et al [102] sur des protoplastes isolés en présence de benzoquinone. Des photocourants (figure 1.32), de l'ordre de quelques dixièmes de nanoampères sont obtenus pour une concentration de benzoquinone de 1 mM<sup>9</sup>. Le fait que ces photocourants proviennent bien du photosystème II a été confirmé en utilisant du DCMU, ce dernier diminuant drastiquement les photocourants. Il est toutefois à noter que cette vérification a été réalisée sur un échantillon déjà irradié. Une baisse pourrait donc s'expliquer par d'autres phénomènes tels que la photoinhibition. Celle-ci semble néanmoins extrêmement forte pour être expliquée par un tel phénomène.

Si cette approche se place en effet dans un aspect préparatif de l'électrochimie, elle ne permet d'interagir qu'avec une cellule isolée, ou tout du moins un faible nombre de cellules. Cela ne permet donc pas de maintenir l'efficacité photosynthétique sous forte irradiation d'une population cellulaire. Il existe dans la littérature [105] une approche permettant la génération de photocourants d'oxydation par transfert d'électrons médié depuis une suspension cellulaire dans des conditions préparatives. Néanmoins, celle ci ne sera pas détaillée plus en détail car le mécanisme déterminé par les auteurs exclut toute action sur la photoinhibition.

## 1.4 Conclusion

Il a été montré dans ces études qu'une dénaturation de l'activité photosynthétique était observée sous forte irradiation. Cette dénaturation étant due, entre autres, à un

---

9. Une autre possibilité de confinement du système consiste à travailler en système miniaturisé. C'est l'approche développée par Koide et al pour suivre l'évolution de la production en O<sub>2</sub> par des cyanobactéries [103, 104].

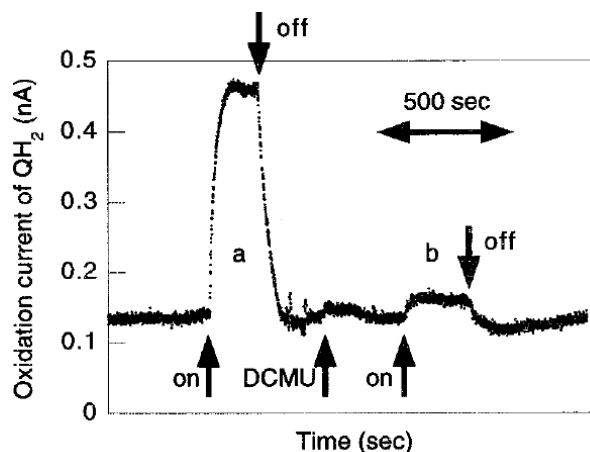


FIGURE 1.32: Courant d'oxydation de la benzoquinone en fonction du temps enregistré sur une électrode disque d'or (10  $\mu\text{m}$  de rayon) placée à environ 1  $\mu\text{m}$  de la membrane du protoplasme. L'électrode est portée à un potentiel de 0,5V/Ag/AgCl, en absence (a) et en présence (b) de 5  $\mu\text{M}$  de DCMU, la concentration en benzoquinone étant de 1 mM et l'intensité lumineuse de 18 Klux. [102]

engorgement de la chaîne d'accepteurs électroniques en aval du photosystème II, une dérivation du surplus d'électrons photosynthétiques pourrait permettre de soulager la chaîne photosynthétique. Ceci permettrait donc de maintenir l'activité photosynthétique sous forte irradiation.

Cette dérivation peut être envisagée selon un grand nombre de manières possibles :

- Un transfert d'électrons direct entre un organisme photosynthétique et une nanoélectrode peut être réalisé en insérant celle-ci dans la cellule. Si cela permet de mesurer des courants, des doutes subsistent quant au caractère non-invasif de la méthode. De plus la sélectivité de la méthode laisse à désirer car la position à laquelle l'électrode intervient dans la chaîne photosynthétique paraît difficilement contrôlable. Enfin, cette méthode n'est pas applicable au cas d'une population cellulaire.
- Une autre possibilité de transfert d'électrons direct consiste à déposer des thylakoïdes isolés sur une électrode. Si l'électrode joue alors un rôle moins invasif, cela nécessite d'extraire des éléments biologiques de leur environnement ce qui est susceptible d'altérer leur activité. De plus, bien que cela permette de travailler sur une population, les courants demeurent faibles, signe d'un mauvais couplage électronique entre l'électrode et la membrane thylakoïde.

- Ce problème de mauvais couplage électronique peut être résolu en utilisant un accepteur d'électron en solution. En l'absence de régénération électrochimique, le système ainsi réalisé ne sera pas stable dans le temps, à cause de la réduction du médiateur.
- Une régénération électrochimique est envisageable sur système adsorbé, différentes échelles étant dès lors possibles (du centre catalytique isolé à la cellule entière). De tels systèmes permettent un temps de réponse bref mais sont susceptibles d'altérer la stabilité du matériel biologique, surtout dans le cas de systèmes extraits.
- Enfin, une régénération sur une suspension d'algues est également envisageable. La régénération électrochimique n'altère a priori plus la stabilité du matériel biologique. Il est possible de moduler les conditions électrochimiques (analytiques ou préparatives) en jouant sur le rapport entre la surface de l'électrode et le volume de la solution. Ceci, ajouté à la surface du faisceau lumineux, définit également le temps de réponse du système. Il est également aisé de moduler la taille de la population sondée en jouant sur la taille de l'électrode en conditions analytiques ou sur le volume du système en conditions préparatives.

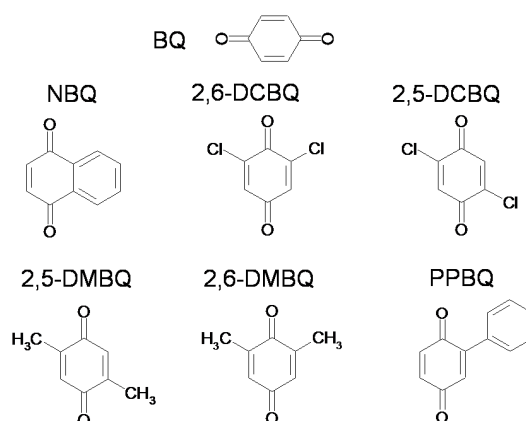


FIGURE 1.33: Structure des différentes quinones envisagées dans la suite de ce manuscrit.

Dans le cadre du travail présenté dans ce manuscrit, la stratégie choisie de dérivation consistera donc à travailler sur population d'algues en présence d'un médiateur exogène. Ainsi, seuls les accepteurs du Photosystème II comme les quinones seront considérés. Si des comparaisons des efficacités des différentes quinones ont déjà été rapportées précédemment dans la littérature, ces dernières restent difficiles à extrapoler puisque l'on peut s'attendre à ce qu'elles dépendent du système envisagé. En effet, à conditions ex-

périementales identiques mais sur des systèmes biologiques différents, les contraintes diffusionnelles ou cinétiques peuvent varier, ce qui pourra jouer sur l'ordre d'efficacité des quinones ciblées. Il est donc préférable dans un premier temps de réaliser une étude comparative de la capacité de plusieurs quinones d'intérêt à dévier les électrons photosynthétiques sur l'entité biologique considérée, ici l'algue unicellulaire *Chlamydomonas reinhardtii*. Les quinones qui seront envisagées dans la suite du manuscrit sont les 2,6-DCBQ, 2,5-DCBQ, 2,6-Diméthylbenzoquinone (2,6-DMBQ), 2,5-DMBQ, PPBQ, BQ et Naphto-benzoquinone (NBQ) dont les structures sont données en figure 1.33.

Ceci sera l'objet du prochain chapitre.

# Chapitre 2

## Evaluation de l'efficacité des médiateurs par fluorescence

### 2.1 Introduction : principe expérimental

Au sein de ce chapitre, nous allons chercher à évaluer et à quantifier la capacité d'un médiateur à dériver les électrons photosynthétiques au niveau du PSII. Dans ce contexte, la fluorescence est une méthode pertinente car directement liée au flux électronique.

#### 2.1.1 La fluorescence, un phénomène directement lié au flux électronique

Lorsque la chlorophylle associée à un photosystème II est irradiée, elle atteint un niveau excité instable. Ce dernier va se désexciter selon plusieurs voies compétitives : désexcitation radiative (c'est-à-dire émission de fluorescence), non-radiative (émission de chaleur par exemple, phénomène indépendant de la présence de quinone) ou photochimique (figure 2.1). Cette dernière correspond à une séparation de charges conduisant à l'apparition d'un flux d'électrons dans la chaîne photosynthétique. Un accepteur d'électron efficace (comme une quinone, tel que décrit dans le chapitre précédent) va oxyder les accepteurs d'électrons endogènes, provoquant donc une hausse du flux électronique. La fluorescence constitue donc un suivi du flux électronique, ainsi lorsque ce dernier augmente, la fluorescence diminue. En l'occurrence, on peut s'attendre à une diminution significative de

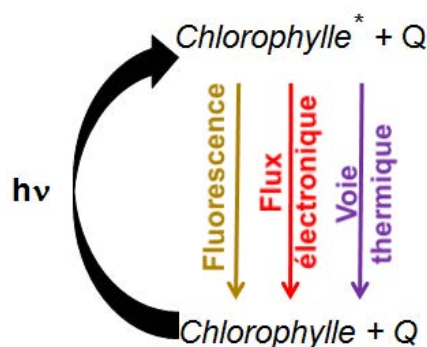


FIGURE 2.1: Schéma des principales voies d'excitation et de désexcitation du photosystème II.

la fluorescence en présence d'un accepteur exogène d'électrons efficace. Néanmoins, une diminution potentielle de fluorescence n'est pas nécessairement liée à une hausse du flux électronique. Ainsi les accepteurs d'électrons considérés dans ce travail, c'est à dire les quinones sont connues pour provoquer l'extinction de la fluorescence ("quenching") émise par des chlorophylles [106,107] en solution.

### 2.1.2 Quenching de la fluorescence de la chlorophylle par des quinones

Le phénomène de quenching de la chlorophylle par des quinones a été étudié dans les années 70 sur de la chlorophylle en solution [107]. Les quinones sont connues pour permettre des transferts d'électrons avec l'état excité de la chlorophylle, mais aucune paire d'ions ni ions séparés n'ont été détectés dans un milieu peu polaire. Ceci peut s'expliquer si l'on regarde les profils d'énergie en fonction de la distance entre la chlorophylle D et l'accepteur noté A, qui peut être une quinone (figure 2.2).

L'irradiation de D en présence de A conduit à la formation de l'état  $D^* + A$ . Un transfert d'électron entre  $D^*$  et A peut alors avoir lieu. Dans le cas d'un milieu peu polaire la séparation des ions ainsi formés n'est pas favorisée. Ils vont donc immédiatement se rapprocher générant la paire d'ion ( $D^+ A^-$ ). Dès lors, une relaxation rapide par recombinaison de charge peut opérer, si les courbes d'énergie présentent une intersection, ce qui explique l'absence de détection de paire d'ions.

Le quenching diminue donc les voies précédentes de désexcitation (y compris la fluorescence) en créant une nouvelle voie de désexcitation concurrentielle des précédentes, à

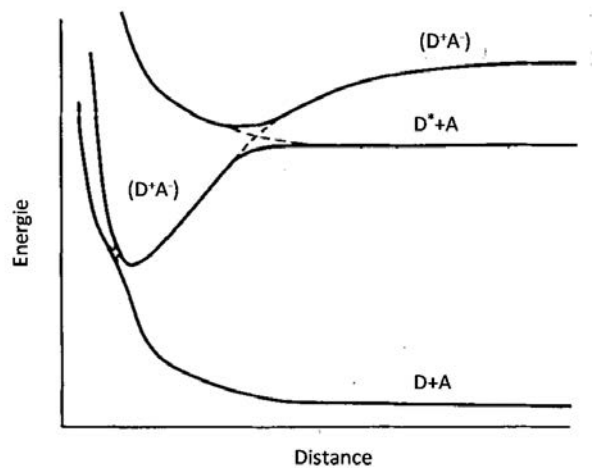


FIGURE 2.2: Energie en fonction de la distance entre la chlorophylle D et l'accepteur A, dans le cas où les deux molécules sont dans leur état fondamental ( $D+A$ ), dans le cas où la chlorophylle est excitée ( $D^*+A$ ) ou dans le cas de la paire d'ions ( $D^+A^-$ ) [107].

travers des transferts d'électrons successifs exothermiques (figure 2.3).

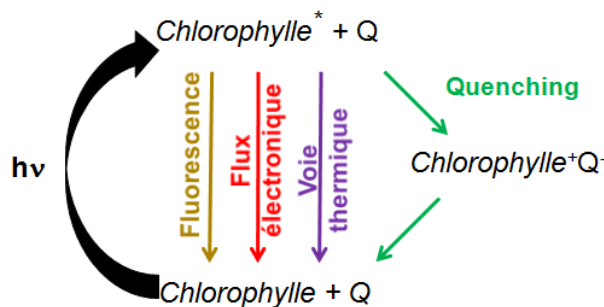


FIGURE 2.3: Schéma des principales voies d'excitation et de désexcitation du photosystème II incluant le quenching, avec Q un quencheur de fluorescence tel qu'une quinone.

Il est à noter que la situation est différente en milieu polaire. En effet un tel milieu favorise la dissociation de la paire d'ions, provoquant, au bilan, une réduction des quinones par le quenching. La suite de notre étude se déroulant sur l'organisme photosynthétique dans sa globalité, le quenching par les quinones se déroulera dans la membrane thylakoïde. Le milieu sera apolaire, et seul le premier mécanisme (sans dissociation de la paire d'ions) sera considéré comme ayant lieu, donc sans réduction de la quinone.

Comme ceci a été mentionné plus haut, une baisse de fluorescence peut traduire la présence de deux phénomènes (quenching et effet d'oxydo-réduction de la quinone). La

quantification de l'action d'oxydo-réduction de la quinone nécessite donc un dispositif expérimental permettant de faire la discrimination entre ces deux voies de baisse de fluorescence.

### 2.1.3 Dispositif expérimental

La mesure de l'effet rédox des quinones sur la chaîne photosynthétique nécessite donc une mesure indépendante du quenching. L'observation du quenching combinée à la mesure de la baisse globale de la fluorescence permettrait de déduire l'oxydation des accepteurs du PSII par les quinones. Pour effectuer cette mesure du quenching, il faut supprimer la désexcitation par séparation de charges (provoquant le flux électronique). Une façon de procéder consiste à saturer d'électrons les accepteurs du photosystème II. Ainsi seules les désexcitations par fluorescence, voie thermiques et quenching seront à considérer. Toute baisse de fluorescence lors de l'ajout de quinones sera donc attribuable au quenching. Ceci peut être effectué expérimentalement en utilisant un pulse de lumière sursaturante. Un schéma de principe est représenté en figure 2.4. L'emploi de cette lumière sursatu-

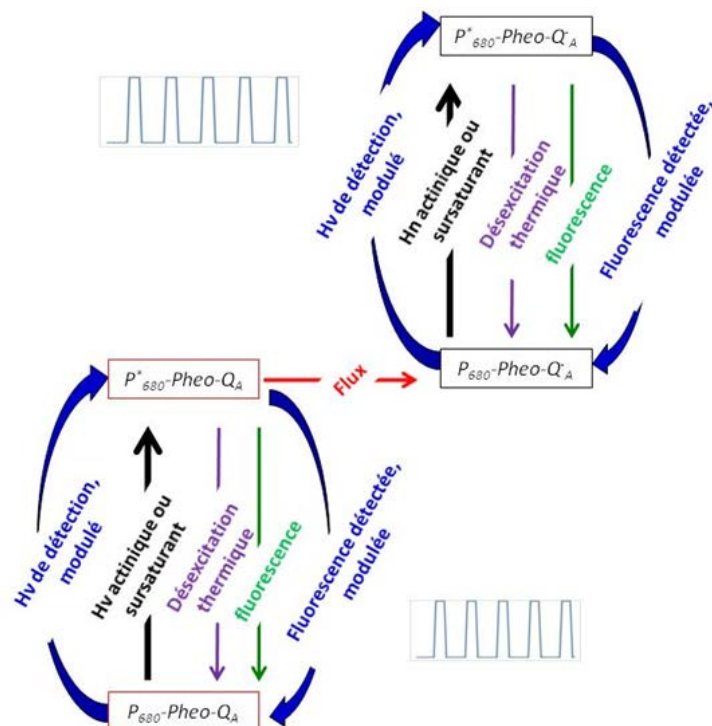


FIGURE 2.4: Schéma de principe du dispositif expérimental de mesure de fluorescence utilisé.

rante entraîne toutefois une complication. En effet, une irradiation plus intense produit



intrinsèquement une fluorescence plus intense, tout phénomène de saturation de la chaîne photosynthétique mis à part. Il est donc nécessaire d'utiliser une autre source de lumière pour provoquer la fluorescence que l'on va mesurer. Cette lumière sera nommée lumière de détection et est modulée. Elle provoque donc une fluorescence modulée de la même manière. Le détecteur est réglé pour ne détecter que la fluorescence ainsi modulée, donc provoquée par une lumière d'amplitude constante. Ceci permet donc de s'affranchir de la hausse intrinsèque de fluorescence due au pulse de lumière sursaturante.

#### 2.1.4 Allure des résultats expérimentaux

Expérimentalement, la lumière de détection est la première à être allumée [108]. En absence de lumière actinique, elle permet de mesurer la fluorescence, notée  $F_0$ , lorsque tous les accepteurs d'électrons sont oxydés c'est à dire lorsque la séparation de charges est à son efficacité maximale.

Puis la lumière actinique est actionnée, avec une intensité constante. Les accepteurs d'électrons vont alors se réduire progressivement, conduisant à une hausse de la fluorescence. Celle ci atteint une valeur stationnaire, notée  $F_{stat}$ , correspondant à une situation dans laquelle les accepteurs d'électrons sont oxydés et réduits à la même vitesse. La proportion d'accepteurs oxydés étant alors constante, l'efficacité de la séparation de charges l'est donc également, ce qui explique le fait que la fluorescence soit stationnaire.

Puis le pulse de lumière sursaturante est appliqué, conduisant à la réduction complète des accepteurs d'électrons endogènes. Il n'y a donc plus de séparation de charges, la fluorescence prendra sa valeur maximale notée  $F_{max}$  (figure 2.5).

Expérimentalement, on n'observe pas de différence marquée entre la fluorescence stationnaire et la fluorescence maximale (au niveau du pulse) en absence de quinone. Cela est dû au fait qu'expérimentalement, un mutant sans cytochrome  $b_6f$  ait été utilisé. La chaîne photosynthétique est en effet interrompue, la séparation de charge n'est donc pas supposée se produire. On retrouve alors une situation similaire à celle du pulse, les intensités de fluorescence étant alors peu différentes [108].

Sous des conditions de faible illumination, une différence entre les fluorescences stationnaire et maximale peut cependant apparaître [108], telle que représentée en figure 2.6.

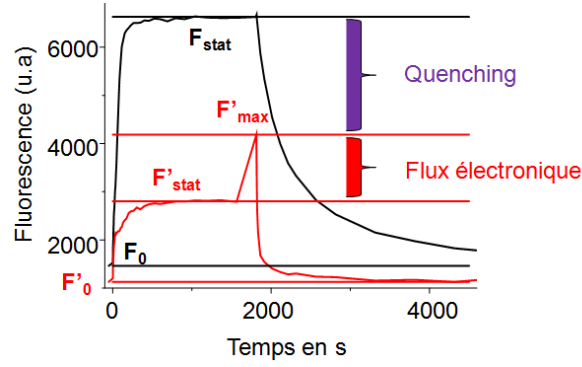


FIGURE 2.5: Allure des résultats expérimentaux, en noir en absence de quinone, en rouge en présence de quinone sur une suspension du mutant  $\Delta PetA$  (sans  $b_6f$ ) de l'algue unicellulaire *Chlamydomonas reinhardtii* à une concentration d'environ  $10^7$  cellules par mL, à  $340 \mu E.m^{-2}.s^{-1}$ .

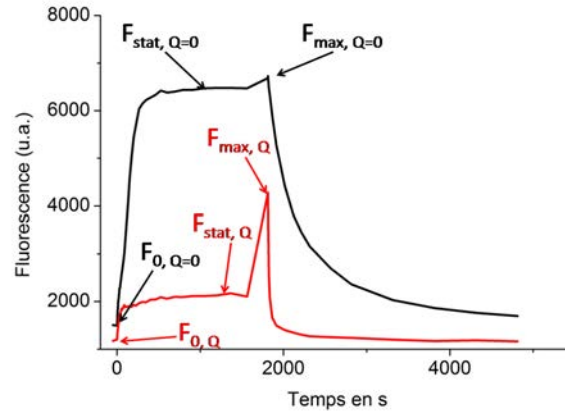


FIGURE 2.6: Allure des résultats expérimentaux, en noir en absence de quinone, en rouge en présence de quinone sur une suspension du mutant  $\Delta PetA$  (sans  $b_6f$ ) de l'algue unicellulaire *Chlamydomonas reinhardtii* à une concentration d'environ  $10^7$  cellules par mL, à  $135 \mu E.m^{-2}.s^{-1}$ .

Cela est dû au fait que même si la chaîne photosynthétique "classique" est interrompue, il existe d'autres voies d'oxydation des accepteurs électroniques endogènes. On pourra citer l'enzyme PTOX, qui est susceptible d'oxyder le pool de plastoquinones [109] ou encore la "back reaction" [110] par recombinaison de charges. Ces voies étant lentes, sous forte irradiation elles sont négligeables devant la vitesse de réduction des accepteurs, s'ils sont entièrement sous forme oxydée. Dès lors, lorsque la fluorescence atteint son niveau stationnaire, ils seront presque entièrement sous forme réduite, d'où une fluorescence identique à  $F_{max}$ .

En revanche, lorsque l'irradiation est plus faible, ces vitesses ne sont pas négligeables

devant la vitesse de photoréduction des accepteurs électroniques. La valeur constante de la fluorescence reflète donc un état stationnaire de ces accepteurs, défini par les cinétiques respectives d'oxydation et de réduction.

Au bilan, ce dispositif expérimental semble donc adapté à la détection de l'action des quinones sur la chaîne photosynthétique. Il convient, dès lors de trouver comment quantifier cette action.

## 2.1.5 Exploitation des résultats expérimentaux

### 2.1.5.1 Approche empirique

Dans un premier temps, le cas des fortes intensités lumineuses est considéré. Dans ces conditions, les niveaux de fluorescence maximale et stationnaire étant identiques en absence de quinone, la dérivation électronique est directement proportionnelle à l'écart entre les fluorescences maximales et stationnaires en présence de quinone (figure 2.5), tel que décrit par Genty et al [111]. Si cette variation de fluorescence entre les fluorescences maximale et stationnaire est normalisée par la variation totale de fluorescence, un rendement de dérivation électronique (oxydation des accepteurs d'électrons par les quinones exogènes) noté  $\phi_Q$  est obtenu :

$$\phi_Q = \frac{F_{max,Q} - F_{stat,Q}}{F_{max,Q} - F_{0,Q}} \quad (2.1)$$

Cependant, comme précisé précédemment, si l'intensité lumineuse est insuffisamment forte pour négliger la back reaction et l'activité de PTOX, la valeur de  $\phi_Q$  ne sera pas nulle en absence de quinone. Cette valeur peut donc s'exprimer selon :

$$\phi_{Q=0} = \frac{F_{max,Q=0} - F_{stat,Q=0}}{F_{max,Q=0} - F_{0,Q=0}} \quad (2.2)$$

Dès lors, le rendement de dérivation électronique provoqué par l'ajout de quinones externes peut s'exprimer :

$$D_Q = \phi_Q - \phi_{Q=0} = \frac{F_{max,Q} - F_{stat,Q}}{F_{max,Q} - F_{0,Q}} - \frac{F_{max,Q=0} - F_{stat,Q=0}}{F_{max,Q=0} - F_{0,Q=0}} \quad (2.3)$$

Ce même paramètre peut s'obtenir en réalisant un calcul moins empirique, en utilisant la notion de sites ouverts/sites fermés.

## 2.1.5.2 Sites ouverts/sites fermés, notion et utilisation

### 2.1.5.2.1 Notion

Le caractère ouvert ou fermé d'un site (centre PS II dans notre cas) est défini par l'état rédox de ses accepteurs électroniques. Les accepteurs électroniques d'un site ouvert sont en effet oxydés. Un tel centre est donc, de fait, susceptible de subir une séparation de charges, à la différence des sites fermés dont les accepteurs électroniques endogènes sont déjà réduits. Le schéma de la figure 2.4 peut être reproduit, en y insérant la notion de sites ouverts/sites fermés (figure 2.7).

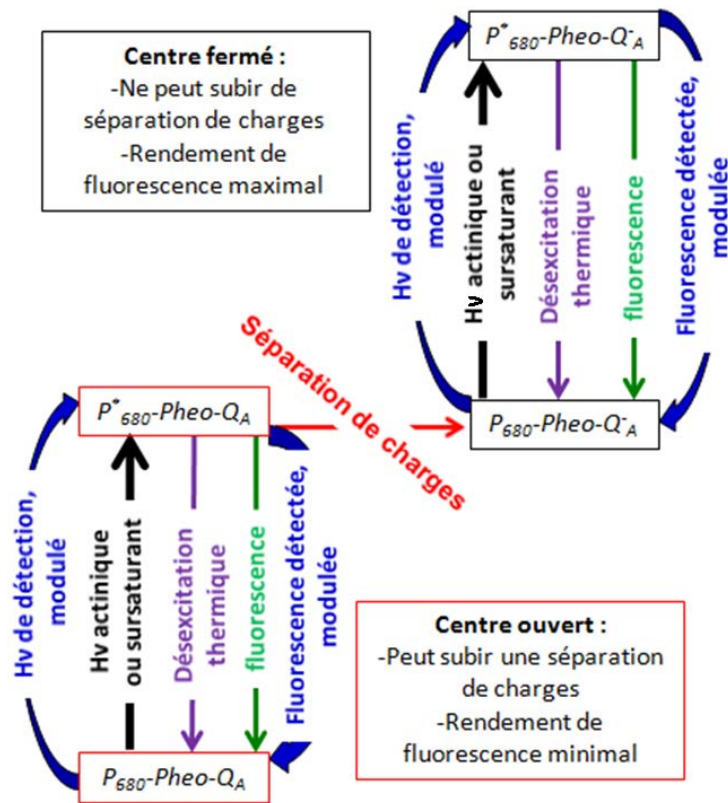


FIGURE 2.7: Schéma de l'expérience réalisée, notion de centres ouverts et centres fermés

Il apparaît que les sites ouverts auront un rendement de fluorescence inférieur à celui des sites fermés car ils ont une voie de désexcitation concurrentielle supplémentaire : la séparation de charges.

La dérivation électronique est alors directement liée à la proportion de sites ouverts. En effet, lors de ce phénomène, les quinones oxydent les accepteurs électroniques, ouvrant

de fait les sites initialement fermés.

### 2.1.5.2.2 Utilisation pour l'exploitation des résultats

La proportion de sites ouverts correspond donc au paramètre précédemment noté  $\phi_Q$ . La situation dans laquelle tous les sites sont ouverts correspond à la situation en absence de lumière. La fluorescence dans une telle situation correspond donc à  $F_0$ . De même, la fluorescence lorsque tous les sites sont fermés est  $F_{max}$ .

La fluorescence mesurée étant la somme de la fluorescence des sites ouverts et de celle des sites fermés, elle peut s'exprimer ainsi :

$$F = F_0\phi + F_{max}(1 - \phi) = F_{max} - \phi(F_{max} - F_0) \quad (2.4)$$

D'où l'on retrouve immédiatement les expressions précédentes de  $\phi$  (équation 2.1) dont découle immédiatement celle de  $D_Q$  (équation 2.3). L'emploi de la notion de sites ouverts/sites fermés permet donc de retrouver l'expression précédente de  $D_Q$ , par un calcul plus rationnel. Il est intéressant de noter que  $D_Q$  ne représente pas la fraction d'électrons dérivés par les quinones mais la variation de cette proportion induite par la présence de quinones. Une identification de ces deux notions suggérerait que le rendement du flux d'électrons endogène serait indépendant de la présence de quinones. Ceci n'est vérifié qu'à forte irradiation. En effet, ce rendement est alors faible, or il est strictement positif et décroissant en fonction de la concentration en quinones.

## 2.2 Comparaison de l'efficacité des différents médiateurs

La comparaison des médiateurs a donc été effectuée sur un mutant, noté  $\Delta PetA$ , de l'algue. La chaîne de transferts d'électron étant alors interrompue par absence de complexe  $b_6f$ , le système aura beaucoup plus de sensibilité à l'ajout de quinones.

Sur un tel mutant, le flux endogène en absence de quinone est faible. On suppose donc qu'on est dans le cas où il peut être supposé constant.

Les premiers résultats seront présentés sur la 2,6-DCBQ, puis étendus à d'autres quinones modèle acceptrices du PSII.

### 2.2.1 Cas de la 2,6-DCBQ

A partir du protocole expérimental donné plus haut et des données de fluorescence en fonction du temps pour plusieurs concentrations de 2,6-DCBQ, il est possible de tracer l'évolution du paramètre  $D_Q$  précédemment obtenu en fonction de la concentration en quinones introduites (figure 2.8) [108].

L'expérience présentée correspond à une irradiation à  $340 \mu\text{E.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  pour laquelle le flux électronique endogène est négligeable (courbe type figure 2.5).

#### 2.2.1.1 Dérivation électronique en fonction de la concentration introduite

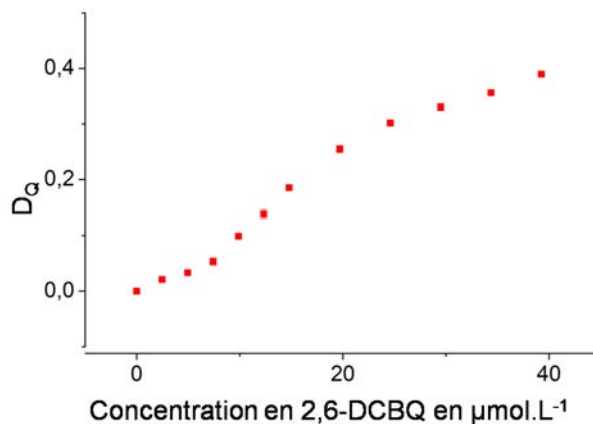


FIGURE 2.8: Dérivation électronique (paramètre  $D_Q$ ) en fonction de la concentration introduite en 2,6-DCBQ en  $\mu\text{mol.L}^{-1}$ , sur une suspension de mutant  $\Delta PetA$  de l'algue unicellulaire *Chlamydomonas reinhardtii* ( $10^7$  cellules par mL)

La courbe  $D_Q=f(C)$  présente un comportement attendu. Ainsi, une hausse de la dérivation électronique est observée dès lors que la concentration introduite en quinones est augmentée. Une saturation semble apparaître aux fortes concentrations. Toutefois, la morphologie de la courbe n'est pas celle d'une simple courbe de saturation, en particulier aux faibles concentrations.

Pour essayer de comprendre l'allure de cette courbe aux faibles concentrations, l'évolution d'un autre paramètre que la dérivation électronique a été considérée : le quenching.

### 2.2.1.2 Observation du quenching

Le quenching de la chlorophylle en solution, provoqué par les quinones, suit la loi de Stern-Volmer [112,113] :

$$F_{max,Q} = \frac{F_{max,Q=0}}{1 + KC} \quad (2.5)$$

Avec K la constante de quenching et C la concentration en quinones. On peut alors définir un paramètre adimensionnel noté Q [108], représentant directement le quenching et qui devrait être directement proportionnel à la concentration en quinone :

$$Q = \frac{F_{max,Q=0} - F_{max,Q}}{F_{max,Q}} = KC \quad (2.6)$$

Ce paramètre a été tracé en fonction de la concentration en 2,6-DCBQ introduite à partir des données expérimentales (figure 2.9).

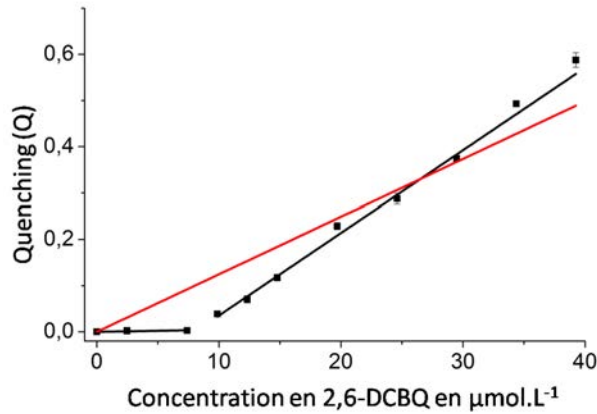


FIGURE 2.9: Quenching (Q) en fonction de la concentration introduite en 2,6-DCBQ en  $\mu\text{mol.L}^{-1}$ , sur une suspension de mutant  $\Delta PetA$  de l'algue unicellulaire *Chlamydomonas reinhardtii* ( $10^7$  cellules par mL), simulations linéaires à paramètres ajustés numériquement sur toute la gamme de concentration (ligne rouge,  $r^2=0,96$ ,  $Q=1,25.10^4 \times C$ ), sur deux gammes de concentration (ligne noire  $r^2=0,84$   $Q=449 \times C$  aux faibles concentrations et  $r^2=0,99$   $Q=1,7910^4 \times C - 0,14332$  aux fortes concentrations)

Il est visible (figure 2.9) que l'équation de Stern-Volmer ne permet pas de décrire convenablement les données obtenues. En effet, deux domaines de concentrations semblent apparaître, cohérents avec une évolution linéaire du quenching avec la concentration, mais avec une rupture de pente marquée entre les deux domaines. La faible valeur du coefficient

de corrélation obtenu aux faibles concentrations s'explique par le faible nombre de points ainsi que par la faible valeur du quenching sur cette gamme de concentrations.

Ceci peut s'expliquer par un phénomène de partition des quinones. En effet, l'algue possède de nombreux composants susceptibles de stocker la quinone. On peut arbitrairement citer trois types de compartiments. Le premier regroupe les membranes non photosynthétiques au sein desquelles les quinones sont de fait perdues pour la photosynthèse. Le deuxième type de compartiment est la membrane thylakoïde, siège de la photosynthèse et donc du quenching. Le troisième est l'ensemble des milieux extramembranaires, insaturables dans la gamme de concentration ici étudiée.

Puisque le quenching est un phénomène qui a lieu à l'intérieur de la membrane thylakoïde, la concentration à laquelle la loi de Stern-Volmer s'applique est donc la concentration à l'intérieur de cette membrane. Cependant, les quinones situées dans le troisième type compartiment ne sont pas perdues pour la photosynthèse, car elles peuvent diffuser à l'intérieur de la membrane. La linéarité de l'évolution du quenching en fonction de la concentration laisse supposer que, sur la gamme de concentration sondée, le quenching est contrôlé par la cinétique d'internalisation des quinones. La loi de Stern-Volmer peut donc s'appliquer aux quinones présentes dans l'ensemble de ces deux compartiments, avec une nouvelle constante de quenching notée  $K'$  (avec  $K' < K$ ), qui tient compte également de la cinétique d'internalisation des quinones.

Ces quinones accessibles à la photosynthèse (membrane thylakoïde + milieux extérieurs) sont en équilibre avec les autres quinones stockées dans les autres compartiments, qui sont alors perdues pour la photosynthèse. Aux faibles concentrations en quinone, les compartiments seront tous insaturés. On peut donc introduire un pseudo-coefficient de partition  $k'$ , défini tel que :

$$k' = \frac{C_{NQ}}{C_Q} \quad (2.7)$$

Avec  $C_Q$  la concentration de quinone accessible au quenching et  $C_{NQ}$  la concentration de quinone non accessible au quenching, et donc à la photosynthèse en général. Ces concentrations ne sont pas les concentrations de quinone effectivement présente dans chaque milieu, mais les quantités de matière de quinone correspondantes divisées par le volume total de solution. C'est pourquoi  $k'$  n'est qu'un pseudo coefficient de partition,



proportionnel au vrai coefficient avec un facteur égal au rapport des volumes de chacune des deux phases.

La conservation de la matière implique :

$$C_{tot} = C_{NQ} + C_Q = C_Q(1 + k') \quad (2.8)$$

L'équation de Stern-Volmer s'écrit donc :

$$Q = K' C_Q = \frac{K'}{1 + k'} C_{tot} = K'' C_{tot} \quad (2.9)$$

La loi de Stern-Volmer s'applique donc strictement aux faibles concentrations, avec une troisième constante de Stern-Volmer  $K''$  définie comme :

$$K'' = \frac{K'}{1 + k'} \quad (2.10)$$

Aux fortes concentrations, la saturation potentielle des compartiments membranaires rend l'équation 2.7 inapplicable. Dans le cas d'une saturation, la concentration perdue pour la photosynthèse sera constante et sera notée  $s$ . En réutilisant la loi de la conservation de la matière, le paramètre de quenching devient :

$$Q = K' C_Q = K'(C_{tot} - s) \quad (2.11)$$

Sur cette gamme de concentration l'évolution du quenching est toujours linéaire, mais la loi de Stern-Volmer ne s'applique plus au sens strict. La nouvelle droite obtenue possède une pente égale à  $K'$ , avec une ordonnée à l'origine non nulle égale à  $-K's$ . De ce modèle, il est donc possible d'extraire les paramètres  $s$ ,  $K'$  (aux fortes concentrations) puis  $k'$  (aux faibles concentrations). Ces valeurs permettent ensuite de calculer la concentration  $C_Q$  et donc de tracer  $D_Q$  en fonction de la concentration, accessible à la photosynthèse  $C_Q$  (figure 2.10).

On remarque alors que la prise en compte de  $C_Q$  au détriment de la concentration ajoutée donne lieu à une courbe  $D_Q=f(C)$  conforme à la courbe de saturation attendue.

La construction d'une courbe  $D_Q=f(C_Q)$  pour chaque quinone exogène va donc permettre d'évaluer la capacité intrinsèque de la quinone à dériver les électrons photosynthétiques. Toutefois, afin d'effectuer une comparaison pertinente de l'efficacité des différents médiateurs, il va être nécessaire d'extraire des paramètres numériques caractéristiques de l'efficacité de la dérivation électronique.

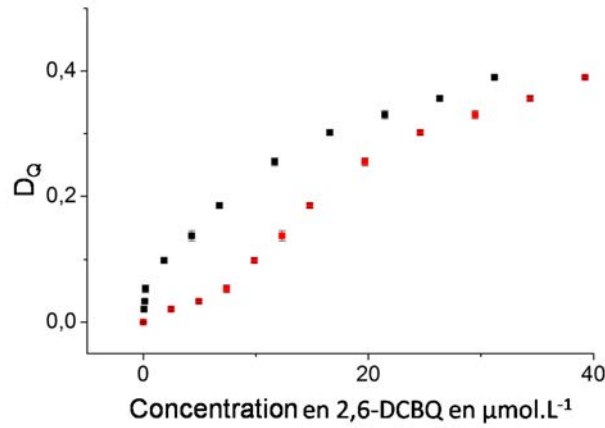


FIGURE 2.10: Dérivation électronique (paramètre  $D_Q$ ) en fonction de la concentration en 2,6-DCBQ en  $\mu\text{mol.L}^{-1}$  introduite ( $C_{tot}$ , en rouge) et accessible au quenching ( $C_Q$ , en noir), sur une suspension de mutant  $\Delta PetA$  de l'algue unicellulaire *Chlamydomonas reinhardtii* ( $10^7$  cellules par mL environ).

### 2.2.1.3 Extraction de paramètres numériques caractéristiques de la dérivation électronique

Au vu de la nature du système et de l'allure de la courbe, les paramètres numériques ont été extraits au moyen de simulations à paramètres ajustés numériquement par une équation de type Michaélis-Menten (figure 2.11).

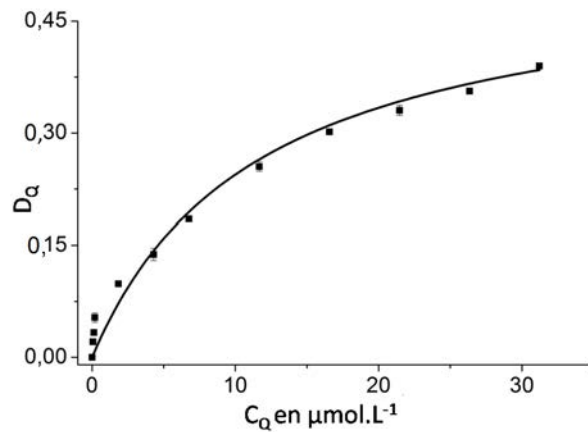


FIGURE 2.11: Dérivation électronique (paramètre  $D_Q$ ) en fonction de la concentration en 2,6-DCBQ en  $\mu\text{mol.L}^{-1}$  accessible au quenching ( $C_Q$ ) sur une suspension de mutant  $\Delta PetA$  de l'algue unicellulaire *Chlamydomonas reinhardtii* ( $10^7$  cellules par mL environ), modélisation par une équation de type Michaélis-Menten ( $r^2=0,99$ ).

L'équation de Michaélis-Menten semble globalement bien respectée, malgré une légère distorsion observée aux faibles concentrations. Celle ci peut s'expliquer par le fait que le quenching étant peu intense sur cette gamme de concentrations, la correction qui y est effectuée est moins précise.

On rappelle l'expression de l'équation de Michaélis-Menten :

$$D_Q = \frac{\rho_0 D_\infty C_Q}{\rho_0 C_Q + D_\infty} \quad (2.12)$$

Avec  $\rho_0$  qui correspond à la pente de la courbe à une concentration nulle et  $D_\infty$  la limite de la courbe pour des concentrations infinies. Dans le cas de cette expérience, une valeur de  $D_\infty$  de 0,58, et une valeur de  $\rho_0$  de  $4,1 * 10^{-2} L.mol^{-1}$  sont obtenues.

### 2.2.2 Comparaison des différents médiateurs

Les autres médiateurs présentent, qualitativement, des comportements similaires à celui décrit plus haut, avec des valeurs des différentes constantes qui peuvent différer d'un médiateur à l'autre, et qui sont résumées dans le tableau 2.1.

Médiateur	K'	s	$D_\infty$	$\rho_0$ (L. $\mu mol^{-1}$ )
2,6-DCBQ	$(1,84 \pm 0,08)10^4$	$19,5 \pm 6,6$	$0,58 \pm 0,06$	$(4,1 \pm 1,4)10^{-2}$
2,5-DCBQ	$(2,28 \pm 0,40)10^4$	$12,0 \pm 0,2$	$0,60 \pm 0,08$	$(5,9 \pm 0,5)10^{-2}$
2,6-DMBQ	$(0,37 \pm 0,04)10^4$	$11,9 \pm 6,8$	nd	$(9,5 \pm 1,2)10^{-4}$
2,5-DMBQ	$(0,45 \pm 0,06)10^4$	$4,1 \pm 0,8$	nd	$(7,4 \pm 1,4)10^{-4}$
PPBQ	$(2,37 \pm 0,19)10^4$	$14,3 \pm 4,9$	$0,48 \pm 0,01$	$(1,7 \pm 0,1)10^{-2}$
BQ	$(0,1 \pm 0,01)10^4$	$36,6 \pm 11$	nd	$(8,1 \pm 1,6)10^{-4}$
NBQ	$(4,93 \pm 0,52)10^4$	$5,0 \pm 1,5$	$0,10 \pm 0,03$	$(4,0 \pm 1,4)10^{-3}$

TABLE 2.1: Tableau récapitulatif des différentes constantes de quenching (K'), partition (s) et dérivation électroniques ( $D_\infty$  et  $\rho_0$ )

Certaines valeurs de  $D_\infty$  n'ont pas pu être déterminées expérimentalement. Cela est dû au fait que, sur la gamme de concentrations sondées, aucun effet de saturation n'a pu être observé. Un exemple de ce type de comportement est représenté dans la figure 2.12.

Par comparaison, le comportement de la 2,6-DCBQ (figure 2.11) présente une saturation débutant dès 30  $\mu\text{M}$ ). Avec ce type de comportement, la pente initiale est trop faible pour permettre d'atteindre la saturation observée aux fortes concentrations comme dans le cas précédent, sur une gamme de concentrations raisonnable. La partie linéaire aux faibles concentrations est donc la seule qui ait pu être observée, ce qui empêche toute détermination fiable du paramètre  $D_\infty$ .

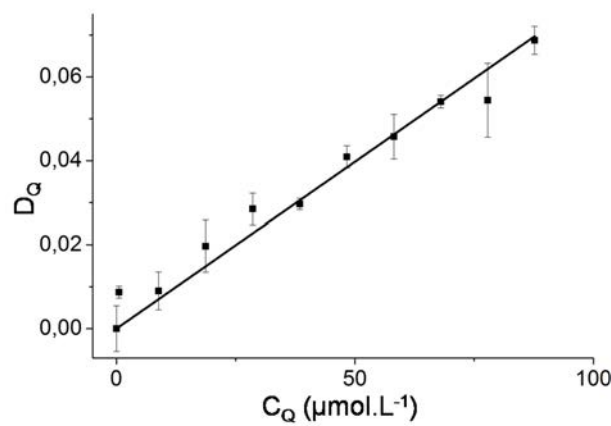


FIGURE 2.12: Dérivation électronique (paramètre  $D_Q$ ) en fonction de la concentration en 2,6-DMBQ en  $\mu\text{mol.L}^{-1}$  accessible au quenching ( $C_Q$ ) sur une suspension de mutant  $\Delta PetA$  de l'algue unicellulaire *Chlamydomonas reinhardtii* ( $10^7$  cellules par mL environ), flux de photons incident de  $340 \mu\text{E.m}^{-2}.s^{-1}$  modélisation par une équation de type Michaelis-Menten.

En conséquence de ces études, on constate que les deux dichlorobenzoquinone et la PPBQ sont les seules à allier à la fois une valeur de  $D_\infty$  raisonnablement forte et une valeur de  $\rho_0$  raisonnablement faible, qui sont les deux conditions nécessaires pour présenter une dérivation électronique efficace sur une gamme de concentration raisonnable. En égard aux objectifs de ce travail, ces mesures de fluorescence permettent d'ores et déjà de sélectionner les meilleures quinones pour extraire les électrons photosynthétiques en sortie du PSII.

Nous avons cherché à aller plus loin via une approche mécanistique afin de mieux cerner l'effet de la concentration et de l'intensité lumineuse.

## 2.3 Etude mécanistique

### 2.3.1 Mécanisme

#### 2.3.1.1 La dérivation électronique, une réaction réversible ?

Dans le cas présent, la dérivation consiste en un transfert d'électrons se produisant au sein de la membrane thylakoïde. Le transfert en question génère de fait une forme hydroquinone, a priori absente à l'extérieur de la membrane. La réaction inverse de la dérivation est donc en compétition avec la diffusion de l'hydroquinone hors de la membrane.

Il convient donc, pour discuter de la réversibilité de la dérivation électronique, d'estimer l'ordre de grandeur du "temps de séjour" de l'hydroquinone à l'intérieur de la membrane thylakoïde, afin de savoir si elle a le temps de rendre ses électrons à la chaîne photosynthétique. Pour cela rappelons qu'une membrane thylakoïde est composée d'une bicouche lipidique d'une épaisseur de 2 nm.

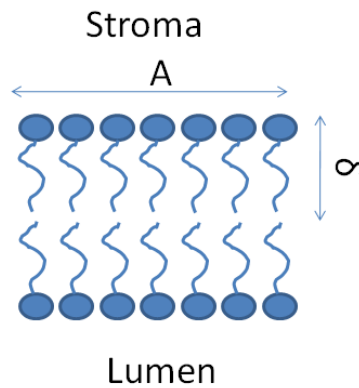


FIGURE 2.13: Schéma d'une membrane thylakoïde représentant les différentes grandeurs géométriques considérées dans l'estimation du temps de séjour de la forme hydroquinone dans la membrane.

Si l'on exprime la variation de la concentration d'une molécule, notée  $C$ , dans un élément de volume  $V$  par diffusion sur une interface d'aire  $A$  et d'épaisseur  $\delta$  (voir figure 2.13), l'équation suivante est obtenue (en considérant que l'espèce est absente du milieu externe) :

$$\frac{dC}{dt} = \frac{ADC}{\delta V} \quad (2.13)$$

Cela revient donc cinétiquement à une réaction d'ordre 1 et de constante de vitesse  $\frac{AD}{\delta V}$ . Le temps de demi vie est donc donné par  $\frac{\ln(2)\delta V}{AD}$ . Supposons que la géométrie permette d'écrire que  $V = A\delta$ . Dès lors le temps de demi-vie devient  $\frac{\ln(2)\delta^2}{D}$ . Le coefficient de diffusion peut être situé à  $10^{-11}m^2.s^{-1}$  (une valeur plus faible du coefficient de diffusion que celle habituelle est prise pour rendre compte des contraintes à la diffusion rencontrées à l'intérieur d'une membrane thylakoïde) quand l'épaisseur de l'interface sera considérée comme étant égale à la moitié de la membrane thylakoïde. Le temps de demi-vie obtenu est de l'ordre de la centaine de nanosecondes.

Or les réactions de transferts d'électrons entre les plastoquinones (présentes en permanence dans la membrane) et la chaîne photosynthétique se produisent dans des temps de vie de l'ordre de la centaine de  $\mu s$  (cf chapitre 1). Il est donc peu probable que la forme hydroquinone puisse rétrocéder son électron à la chaîne photosynthétique.

Toutefois, le calcul présenté ici doit être vu avec une certaine prudence. En effet le système photosynthétique est extrêmement complexe tant d'un point de vue de la géométrie que des caractéristiques diffusionnelles. Cela oblige donc à considérer des approximations relativement grossières, telles que l'hypothèse sur la géométrie, ou l'épaisseur de l'interface égale à la moitié de la membrane. Les conditions diffusionnelles sont également difficiles à estimer, telles que la valeur du coefficient de diffusion à l'intérieur de la membrane<sup>1</sup> ou encore la linéarité du profil de concentration. Notons toutefois que l'allure d'un profil de concentration est dépendant de la géométrie si les effets de bords ne sont pas négligeables. Celle ci n'étant pas clairement définie, une approximation est nécessaire.

Le résultat obtenu ici est probablement surestimé. En effet, l'une des approximations les plus grossières consiste à considérer que l'épaisseur de l'interface est égale à la moitié de la membrane. Cela revient en effet à considérer le volume à l'intérieur de la membrane

---

1. Le coefficient de diffusion est probablement dépendant de la position de la molécule dans la membrane car il ne s'agit pas d'un milieu isotrope. Les contraintes de diffusion peuvent donc être dépendantes de la position de la molécule. Une considération plus classique nécessiterait donc de diviser la membrane traversée par la molécule lors de la diffusion en  $N$  éléments de volume isotropes, à l'intérieur desquels les coefficients de diffusion respectifs sont par définition scalaires. Le coefficient de diffusion considéré dans le calcul correspondrait donc à la moyenne des coefficients de diffusion dans les différents éléments de volume isotropes traversés par les molécules, pondérée par la proportion de molécules dans chacun de ces éléments de volume.

thylakoïde (contenant la chlorophylle et les différents organites impliqués dans la photosynthèse) comme une fraction négligeable par rapport à l'interface. Cette hypothèse, bien que critiquable, est nécessaire car la distribution des quinones à l'intérieur de la membrane est inconnue.

Quoi qu'il en soit, le fait que les hypothèses considérées conduisent probablement à une surestimation du temps de vie de  $QH_2$  dans la membrane thylakoïde suggère que la réaction de dérivation électronique est irréversible.

### 2.3.1.2 Proposition de mécanisme

L'élément  $Q_A^-$  est identifié dans la littérature comme le site d'action potentiel des quinones exogènes, via une fixation de la quinone dans la poche  $Q_B$ , comme cela a été mentionné au premier chapitre. De plus, la dérivation électronique semble être un phénomène irréversible.

La combinaison de ces observations permet de proposer le mécanisme schématisé de la transformation  $Q + Q_A^- = Q^- + Q_A$  en figure 2.14. Il s'agit d'un mécanisme simplifié, car il ne tient pas compte des phénomènes décrits au premier chapitre liés au fait que  $Q_A$  soit monoélectronique et la quinone exogène biélectronique. Lorsque la fluorescence

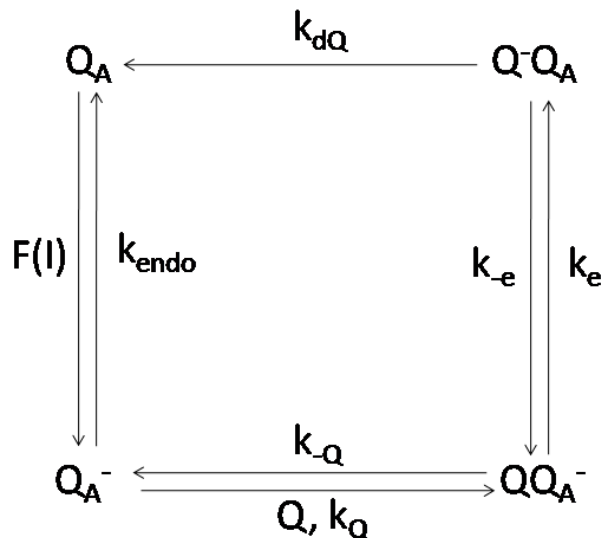


FIGURE 2.14: Mécanisme proposé de la dérivation électronique

est stationnaire, la proportion de sites ouverts, donc celle des différents états, doit être

constante. Les égalités ci dessous peuvent donc être écrites :

$$F(I)(Q_A) + k_{-Q}(QQ_A^-) = (Q_A^-)(k_{endo} + C_Q k_Q) \quad (2.14)$$

$$(Q_A^-)C_Q k_Q + (Q^- Q_A)k_{-e} = (QQ_A^-)(k_{-Q} + k_e) \quad (2.15)$$

$$(QQ_A^-)k_e = (Q^- Q_A)(k_{-e} + k_{dQ}) \quad (2.16)$$

$$(Q_A) + (Q_A^-) + (QQ_A^-) + (Q^- Q_A) = 1 \quad (2.17)$$

Avec  $(Q_A)$ ,  $(Q_A^-)$ ,  $(QQ_A^-)$  et  $(Q^- Q_A)$  les proportions relatives de chaque état. Cela constitue donc un système de 4 équations à 4 inconnues, dont la résolution conduit aux équations suivantes :

$$(Q_A) = \frac{k_{endo} (k_{-Q} k_{-e} + k_{-Q} k_{dQ} + k_{dQ} k_e) + C_Q k_Q k_e k_{dQ}}{(k_{endo} + F(I)) (k_{-Q} (k_{-e} + k_{dQ}) + k_{dQ} k_e) + C_Q k_Q (F(I) (k_E + k_{-e} + k_{dQ}) + k_E k_{dQ})} \quad (2.18)$$

$$(Q_A^-) = \frac{F(I) (k_{-Q} k_{-e} + k_{-Q} k_{dQ} + k_{dQ} k_e)}{(k_{endo} + F(I)) (k_{-Q} (k_{-e} + k_{dQ}) + k_{dQ} k_e) + C_Q k_Q (F(I) (k_E + k_{-e} + k_{dQ}) + k_E k_{dQ})} \quad (2.19)$$

$$(QQ_A^-) = \frac{F(I) k_Q C_Q (k_{-e} + k_{dQ})}{(k_{endo} + F(I)) (k_{-Q} (k_{-e} + k_{dQ}) + k_{dQ} k_e) + C_Q k_Q (F(I) (k_E + k_{-e} + k_{dQ}) + k_E k_{dQ})} \quad (2.20)$$

$$(Q^- Q_A) = \frac{F(I) k_E k_Q C_Q}{(k_{endo} + F(I)) (k_{-Q} (k_{-e} + k_{dQ}) + k_{dQ} k_e) + C_Q k_Q (F(I) (k_E + k_{-e} + k_{dQ}) + k_E k_{dQ})} \quad (2.21)$$

### 2.3.1.3 Implications du mécanisme

Il est alors possible de chercher à déterminer quels sont les phénomènes dominants en fonction des différents domaines de concentration en quinone et d'intensité lumineuse et de déterminer une évolution générale de la proportion de sites ouverts. Si on suppose que la proportion de sites ouverts mesurée est égale à la proportion de  $Q_A$ , le rapport entre les flux endogènes et exogènes correspond au ratio des termes de gauche et de droite. La concentration en quinone seuil à partir de laquelle le flux exogène devient supérieur au flux endogène (notée  $C_{Q,seuil}$ ) est définie comme :

$$C_{Q,seuil} = \frac{k_{endo} Z}{k_Q k_e k_{dQ}} \quad (2.22)$$



Avec  $Z = k_{-Q}k_{-e} + k_{-Q}k_{dQ} + k_{dQ}k_e$ . On peut dès lors introduire un paramètre adimensionnel noté  $\alpha$  représentant la concentration et défini ainsi :

$$\alpha = \frac{C_Q}{C_{Q,seuil}} = C_Q \frac{k_Q k_e k_{dQ}}{k_{endo} Z} \quad (2.23)$$

L'expression de la proportion de sites ouverts devient :

$$\phi = Q_A = \frac{k_{endo}(1 + \alpha)}{k_{endo} + F(I) + \alpha k_{endo} \left( \frac{F(I)B}{k_e k_{dQ}} + 1 \right)} \quad (2.24)$$

Avec  $B = (k_e + k_{-e} + k_{dQ})$ . Le flux exogène sera donc majoritaire pour une valeur de  $\alpha$  supérieure à 1. Le flux exogène peut lui même être contrôlé par deux phénomènes qui sont l'insertion de la quinone dans la poche  $Q_B$  et le transfert d'électron entre la quinone ainsi localisée et  $Q_A$ . La vitesse de transfert d'électrons deviendra prépondérante dans le flux exogène pour la valeur de  $\alpha$  donnée ci dessous et notée  $\beta$  :

$$\alpha = \frac{k_{endo} + F(I)}{k_{endo} \left( \frac{F(I)B}{k_e k_{dQ}} + 1 \right)} = \beta \quad (2.25)$$

L'expression de la proportion de sites ouverts devient donc :

$$\phi = \frac{k_{endo}}{k_{endo} + F(I)} \frac{(1 + \alpha)\beta}{\beta + \alpha} = \phi_0 \frac{(1 + \alpha)\beta}{\beta + \alpha} \quad (2.26)$$

Avec  $\phi_0$  la proportion de sites ouverts en absence de quinones. Il apparaît que la proportion de sites ouverts n'est pas une fonction forcément croissante de la concentration en quinone. En effet l'équation (2.26) montre que la dérivée de la proportion de sites ouverts par  $\alpha$  est du signe de  $\beta^2 - \beta$ , donc positive pour des valeurs de  $\beta > 1$  et négative pour  $\beta < 1$ . Ces deux grandes zones seront qualifiées de zone normale ( $\beta > 1$  donc proportion de sites ouverts augmentant avec la concentration en quinone) et zone inverse ( $\beta < 1$  donc proportion de sites ouverts augmentant avec la concentration en quinone).

De l'expression de  $\beta$  (équation 2.25), il vient immédiatement que la transition entre la zone normale et la zone inverse est liée au paramètre  $\frac{k_{endo}B}{k_e k_{dQ}}$ . Lorsque ce paramètre est supérieur à 1, le système fonctionne en zone inverse et en zone normale lorsqu'il est inférieur à 1. Ce paramètre rend donc compte du ratio des cinétiques du flux endogène sur le flux électronique partant de  $QQ_A^-$ . Lorsqu'il est inférieur à 1 l'addition de quinone permet une transition du site vers un état qui s'ouvre plus rapidement. Il est donc logique que la proportion de sites ouverts augmente avec la concentration en quinones, ce qui se traduit

par un positionnement en zone normale. Lorsque le paramètre est supérieur à 1, l'addition de quinone permet une transition du site vers un état qui s'ouvre moins rapidement. Il est donc logique que la proportion de sites ouverts diminue avec la concentration en quinones, ce qui se traduit par un positionnement en zone inverse.

Un graphique en 3 dimensions permet d'observer cette transition entre la zone Inverse et la zone Normale. Cela a été représenté en figure 2.15. Il est bien visible en premier plan ( $\text{Log}(\beta) < 0$ , zone Inverse) que la proportion de sites ouverts décroît avec la concentration en quinone, alors qu'elle augmente avec la concentration en arrière plan ( $\text{Log}(\beta) > 0$ , zone Normale).

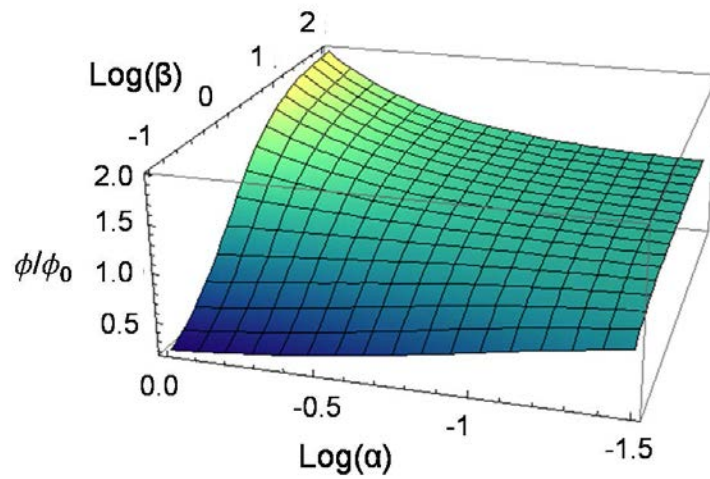


FIGURE 2.15: Diagramme 3D représentant la proportion de sites ouverts en fonction de  $\text{Log}(\alpha)$  et de  $\text{Log}(\beta)$

Un diagramme de zones a été tracé (figure 2.16), représentant les zones inverse et normale, ainsi que les domaines de prédominance des différents phénomènes. Nous allons maintenant nous attacher à décrire chaque zone et à y définir la proportion de sites ouverts.

Dans la zone notée 5 (zone mixte), aucun phénomène n'est négligeable. Néanmoins, cette zone peut être divisée en 4 zones : le flux exogène est plus important dans les zones 5.2 et 5.4, contrairement aux zones 5.1 et 5.3. La limitation par le transfert d'électrons est plus importante dans les zones 5.1 et 5.2, contrairement aux zones 5.3 et 5.4. Aucune expression simplifiée de la proportion de sites ouverts n'est donc accessible :

$$\phi_5 = \phi_0 \frac{(1 + \alpha)\beta}{\beta + \alpha} = \frac{\frac{\phi_0 D_\infty}{\rho_0} + D_\infty C_Q}{\frac{D_\infty}{\rho_0} + C_Q} \quad (2.27)$$

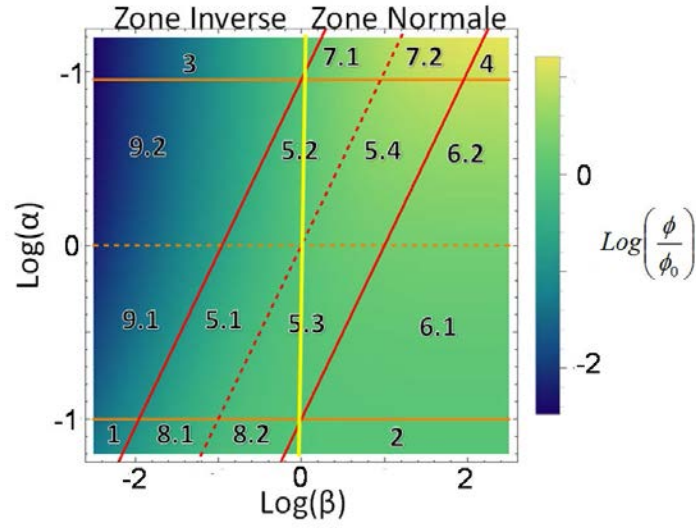


FIGURE 2.16: Diagramme de zones résumant les différents domaines. La ligne jaune représente la transition entre la zone inverse et la zone normale. La ligne pointillée orange est la condition pour laquelle les flux endogène et exogène sont identiques, les lignes continues orange représentant les transitions à partir desquelles l'un des deux flux peut être négligé (à 10% près). La ligne pointillée rouge représente la condition pour laquelle le flux exogène est limité par l'arrivée de la quinone au site et par le transfert d'électron à égalité. Les lignes continues rouges représentent les domaines dans lesquels l'un des deux phénomènes peut être négligé. Les couleurs de fond permettent une estimation de la valeur de  $\phi/\phi_0$ .

Dans la zone notée 1, le flux exogène est négligeable devant le flux endogène ( $D_\infty C_Q \ll \frac{\phi_0 D_\infty}{\rho_0}$ ) et est limité par le transfert d'électrons ( $\frac{D_\infty}{\rho_0} \ll C_Q$ ). La proportion de sites ouverts est donc inversement proportionnelle à la concentration en quinone (ces conditions ne sont possibles qu'en zone Inverse), et l'expression de la proportion de sites ouverts devient :

$$\phi_1 = \phi_0 \frac{\beta}{\alpha} = \phi_0 \frac{D_\infty}{C_Q \rho_0} \quad (2.28)$$

Dans la zone notée 2, le flux exogène est négligeable devant le flux endogène ( $D_\infty C_Q \ll \frac{\phi_0 D_\infty}{\rho_0}$ ) et est limité par l'arrivée de la quinone au site ( $\frac{D_\infty}{\rho_0} \gg C_Q$ ). La proportion de sites ouverts est donc indépendante de la concentration en quinone (conditions possibles en zone Inverse et en zone Normale), et l'expression de la proportion de sites ouverts devient égale à la proportion de sites ouverts en absence de quinone :

$$\phi_2 = \phi_0 \quad (2.29)$$

Dans la zone notée 3, le flux endogène est négligeable devant le flux exogène ( $D_\infty C_Q \gg \frac{\phi_0 D_\infty}{\rho_0}$ ) qui est limité par la cinétique de transfert d'électrons ( $\frac{D_\infty}{\rho_0} \ll C_Q$ ). La proportion de sites ouverts est donc indépendante de la concentration en quinone (conditions possibles en zone Inverse et en zone Normale), et l'expression de la proportion de sites ouverts devient égale à :

$$\phi_3 = \phi_0 \beta = D_\infty \quad (2.30)$$

Dans la zone notée 4, le flux endogène est négligeable devant le flux exogène ( $D_\infty C_Q \gg \frac{\phi_0 D_\infty}{\rho_0}$ ) qui est limité par l'arrivée de la quinone au site ( $\frac{D_\infty}{\rho_0} \gg C_Q$ ). La proportion de sites ouverts est donc proportionnelle à la concentration en quinone (conditions uniquement possibles en zone Normale), et l'expression de la proportion de sites ouverts devient égale à :

$$\phi_4 = \phi_0 \alpha = \rho_0 C_Q \quad (2.31)$$

Dans la zone notée 6, le flux exogène est limité par l'arrivée de la quinone au site ( $\frac{D_\infty}{\rho_0} \gg C_Q$ ). Les flux endogène et exogène ne sont négligeables ni l'un ni l'autre mais cette zone peut être divisée en deux : le flux exogène est prépondérant dans la zone 6.2 au contraire de la zone 6.1. La proportion de sites ouverts est donc une fonction affine croissante de la concentration en quinone (conditions uniquement possibles en zone Normale), et l'expression de la proportion de sites ouverts devient égale à :

$$\phi_6 = \phi_0(1 + \alpha) = \phi_0 + \rho_0 C_Q \quad (2.32)$$

Dans la zone notée 7, le flux endogène est négligeable devant le flux exogène ( $D_\infty C_Q \gg \frac{\phi_0 D_\infty}{\rho_0}$ ). Aucune étape n'est cinétiquement négligeable dans le flux exogène, néanmoins la zone peut être divisée en deux. Dans la zone 7.2, l'arrivée de la quinone au site est prépondérante dans le contrôle du flux exogène. La proportion de sites ouverts est donc une fonction rationnelle croissante de la concentration en quinone (conditions uniquement possibles en zone Normale), et l'expression de la proportion de sites ouverts devient égale à :

$$\phi_7 = \phi_0 \frac{\alpha \beta}{\beta + \alpha} = \frac{C_Q D_\infty}{\frac{D_\infty}{\rho_0} + C_Q} \quad (2.33)$$

Dans la zone notée 8, le flux exogène est négligeable devant le flux endogène ( $D_\infty C_Q \ll \frac{\phi_0 D_\infty}{\rho_0}$ ). Aucune étape n'est cinétiquement négligeable dans le flux exogène, néanmoins la

zone peut être divisée en deux. Dans la zone 8.2, l'arrivée de la quinone au site est prépondérante dans le contrôle du flux exogène. La proportion de sites ouverts est donc une fonction rationnelle décroissante de la concentration en quinone (conditions uniquement possibles en zone Inverse), et l'expression de la proportion de sites ouverts devient égale à :

$$\phi_8 = \phi_0 \frac{\beta}{\beta + \alpha} = \frac{\phi_0 D_\infty}{D_\infty + \rho_0 C_Q} \quad (2.34)$$

Dans la zone notée 9, le flux exogène est limité par la cinétique de transfert d'électrons ( $\frac{D_\infty}{\rho_0} \ll C_Q$ ). Les flux endogènes et exogènes ne sont négligeables ni l'un ni l'autre mais cette zone peut être divisée en 2 : le flux exogène est prépondérant dans la zone 9.2 au contraire de la zone 9.1. La proportion de sites ouverts est donc une fonction rationnelle décroissante de la concentration en quinone (conditions uniquement possibles en zone Inverse), et l'expression de la proportion de sites ouverts devient égale à :

$$\phi_9 = \phi_0 \frac{(1 + \alpha)\beta}{\alpha} = \frac{\frac{\phi_0 D_\infty}{\rho_0} + D_\infty C_Q}{C_Q} \quad (2.35)$$

## 2.3.2 Application du mécanisme : étude en fonction de la concentration et de l'intensité lumineuse

Afin de tester le mécanisme ainsi défini sur un exemple pratique, une étude en fonction de l'intensité lumineuse incidente et de la concentration en quinone a été effectuée. Le modèle a d'abord été testé sur une suspension de mutants sans  $b_6f$  de *Chlamydomonas reinhardtii* nommées fl<sup>2</sup> (caractéristiques similaires aux PetA), donc dans des conditions similaires aux précédentes.

### 2.3.2.1 Cas du mutant sans $b_6f$

Les mêmes phénomènes de partition que ceux commentés précédemment ont été également observés. La concentration en quinone utilisée ici correspond donc directement à la concentration en quinone accessible au quenching, car corrigée des phénomènes de partition. De plus, les paramètres obtenus quant à la dérivation électronique sont également cohérents avec les précédents. Ceci montre que les mutants fl et  $\Delta$ PetA, deux modèles

---

2. Ces cellules ont été utilisées à la place des PetA suite à une évolution de ces dernières survenue entre temps.

cellulaires sans b<sub>6</sub>f, présentent des propriétés similaires et sont des modèles pertinents pour notre étude.

La première question d'intérêt consiste à examiner l'effet intrinsèque de l'intensité lumineuse. Le paramètre qui permet de l'étudier le plus simplement est la proportion de sites ouverts (calculée selon  $\frac{F_{max}-F_{stat}}{F_{max}-F_0}$  comme vu partie 2.1.5) en absence de quinone.

### 2.3.2.1.1 Etude de l'influence de l'intensité lumineuse sur la proportion de sites ouverts en absence de quinones

En absence de quinone, le système d'équations précédent se simplifie drastiquement. En effet, on aura alors  $(QQ_A^-) = (Q^-Q_A) = 0$ . La proportion de sites ouverts est alors égale à  $(Q_A)$  dont l'expression devient :

$$\Phi_0 = \frac{k_{endo}}{k_{endo} + F(I)} \quad (2.36)$$

L'inverse de ce paramètre est donc une fonction linéaire de  $F(I)$ . Ceci a été tracé en fonction du flux de photons incidents (figure 2.17) :

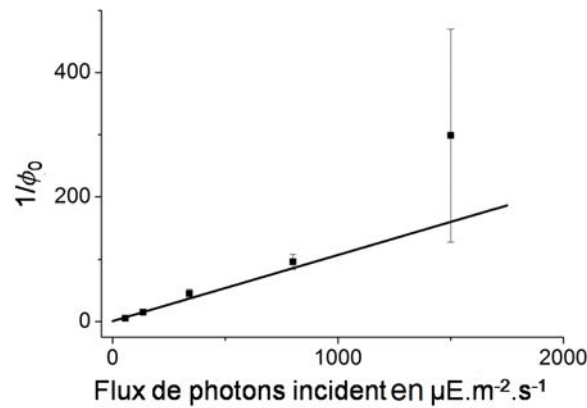


FIGURE 2.17: Inverse de la proportion de sites ouverts en absence de quinones sur une suspension de mutants fl de *Chlamydomonas reinhardtii* en fonction du flux de photons incident, modélisation par une fonction affine ( $1+0,10636I$ ,  $r^2 = 0,995$  (point à 1500  $\mu E.m^{-2}.s^{-1}$  non pris en compte).

A 1500  $\mu E.m^{-2}.s^{-1}$  l'incertitude est extrêmement grande car  $\phi_0$  est alors très faible. Ce point, bien que figurant sur le graphique, n'a donc pas été utilisé pour ajuster le

modèle. L'évolution semble linéaire ce qui indique que  $F(I)$  est une fonction linéaire du flux de photons incident. Cela signifie que le système n'est pas contrôlé par des étapes de cinétique de transfert d'énergie ou d'électrons en amont de  $Q_A$  mais par l'intensité lumineuse elle-même.

### 2.3.2.1.2 Evolution de la proportion de sites ouverts en fonction de la concentration en quinones

La figure 2.18 illustre l'effet de  $C_Q$  et du flux lumineux incident sur la proportion de sites ouverts.

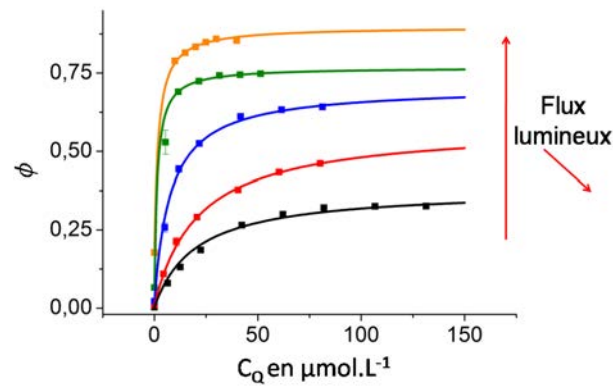


FIGURE 2.18: Evolution de la proportion de sites ouverts en fonction de la concentration en 2,6-DCBQ en  $\mu\text{mol/L}$  pour des flux de photons incidents (en  $\mu\text{E.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ ) de 56 (orange), 135 (vert), 340 (bleu), 800 (rouge) et 1500 (noir).

On constate que la proportion de sites ouverts augmente lorsque le flux de photons incident diminue. Ceci s'explique par le fait que  $\phi_Q$  est un rendement qui exprime une compétition entre la réduction de  $Q_A$  photoinduite et sa régénération par les accepteurs exogènes et endogènes. Le flux lumineux ferme les sites et donc diminue le rendement.

Les différentes courbes ont été modélisées en ajustant numériquement une équation correspondant au mécanisme précédent, de type :

$$\phi = \frac{\phi_0 \frac{D_\infty}{\rho_0} + D_\infty C_Q}{\frac{D_\infty}{\rho_0} + C_Q} \quad (2.37)$$

Avec  $\phi_0$  la proportion de sites ouverts en absence de quinone,  $D_\infty$  la proportion de sites

ouverts pour une concentration infinie en quinones et  $\rho_0$  la pente initiale de la dérivation électronique.

Ces paramètres ont donc pu être obtenus lors des modélisations, et leur évolution en fonction de l'intensité lumineuse a pu être étudiée.

Intensité lumineuse	$D_\infty$	$\rho_0 10^{-4} (L.mol^{-1})$	$\phi_0$	$r^2$
1500	$0,38 \pm 0,01$	$1,9 \pm 0,3$	$(3,34 \pm 2)10^{-3}$	0,9985
800	$0,58 \pm 0,01$	$2,7 \pm 0,1$	$(1,0 \pm 0,1)10^{-2}$	0,99991
340	$0,71 \pm 0,01$	$9,0 \pm 0,5$	$(2,2 \pm 0,3)10^{-2}$	0,99974
135	$0,77 \pm 0,008$	$54 \pm 1$	$(6,6 \pm 0,2)10^{-2}$	0,99998
56	$0,89 \pm 0,19$	$47 \pm 9$	$0,18 \pm 0,03$	0,9999

TABLE 2.2: Tableau récapitulatif des différents paramètres déterminant la proportion de sites ouverts sur les cellules f1.

### 2.3.2.1.3 Influence du flux de photons incident sur la valeur de $D_\infty$

On pourrait s'attendre à ce que, en présence de quinone, la proportion de sites ouverts soit égale à la somme des proportions de  $Q_A$  et de  $Q^-Q_A$ . Cela conduirait à l'équation :

$$\phi = \frac{k_{endo}(k_{-Q}k_{-e} + k_{-Q}k_{dQ} + k_{dQ}k_e) + Qk_Qk_e(k_{dQ} + F(I))}{(k_{endo} + F(I))(k_{-Q}(k_{-e} + k_{dQ}) + k_{dQ}k_e) + Qk_Q(F(I)(k_E + k_{-e} + k_{dQ}) + k_Ek_{dQ})} \quad (2.38)$$

D'où l'on déduit l'expression de  $D_\infty$  :

$$D_\infty = \frac{k_e(k_{dQ} + F(I))}{(F(I)(k_E + k_{-e} + k_{dQ}) + k_Ek_{dQ})} \quad (2.39)$$

L'inverse de ce paramètre a donc été tracé en fonction du flux de photons incident (figure 2.19), le point à forte intensité lumineuse est à présent mesuré avec une incertitude acceptable, car la proportion de sites ouverts pour une forte concentration en quinones est suffisamment grande. L'évolution est linéaire, ce qui semble indiquer soit que  $Q^-Q_A$  ne peut subir de nouvelle irradiation, et appartient donc de fait aux sites fermés, soit que sous ces conditions d'irradiation sa proportion à l'état stationnaire est négligeable, et qu'il n'est donc pas détecté. Dans ce dernier cas, une saturation de l'allure de la courbe devrait être obtenue à des flux de photons supérieurs à ceux présentés ici.



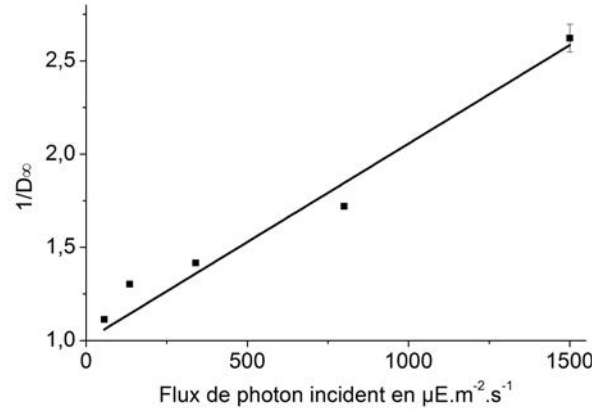


FIGURE 2.19: Evolution de l'inverse de  $D_\infty$  en fonction du flux de photons incident en  $\mu E.m^{-2}.s^{-1}$ , modèle linéaire à paramètre ajusté numériquement ( $1+0,00106I$ ,  $r^2=0,996$ ).

L'expression de  $D_\infty$  devient donc :

$$D_\infty = \frac{k_e k_{dQ}}{F(I) (k_E + k_{-e} + k_{dQ}) + k_E k_{dQ}} \quad (2.40)$$

Une corrélation peut dès lors être obtenue entre l'inverse de  $D_\infty$  et l'inverse de  $\phi_0$ . En effet de l'équation (2.41) il vient :

$$\frac{1}{D_\infty} = \left( \frac{k_{endo}}{\phi_0} - k_{endo} \right) \frac{k_E + k_{-e} + k_{dQ}}{k_E k_{dQ}} + 1 \quad (2.41)$$

$$\frac{1}{D_\infty} - 1 = \left( \frac{1}{\phi_0} - 1 \right) k_{endo} \frac{k_E + k_{-e} + k_{dQ}}{k_E k_{dQ}} = \left( \frac{1}{\phi_0} - 1 \right) \frac{p_1}{p_2} \quad (2.42)$$

Avec  $p_1$  et  $p_2$  les pentes respectivement des courbes de  $1/D_\infty$  et de  $1/\phi_0$  en fonction de l'intensité lumineuse. La courbe ainsi obtenue est superposée aux données expérimentales (figure 2.20). Le résultat semble globalement cohérent avec la théorie mise en place. La tendance est confirmée, même si des incertitudes fortes subsistent sur les valeurs. Un plus grand nombre de valeurs d'intensité serait toutefois souhaitable pour confirmer définitivement la loi de variation, même si des contraintes expérimentales (nombre d'intensités lumineuses sélectionnables sur l'équipement dans cette gamme d'intensité) nous limitent à ce sujet. Par ailleurs, la valeur pour un flux de  $1500 E.m^{-2}.s^{-1}$  n'a pas été utilisée due à la trop forte incertitude sur  $\phi_0$ .

#### 2.3.2.1.4 Influence du flux de photons incident sur $\rho_0$

Ce paramètre se déduit des équations (2.18) et (2.37) :

$$\rho_0 = \frac{k_Q k_e k_{dQ}}{(k_{endo} + F(I)) (k_{-Q} (k_{-e} + k_{dQ}) + k_{dQ} k_e)} \quad (2.43)$$

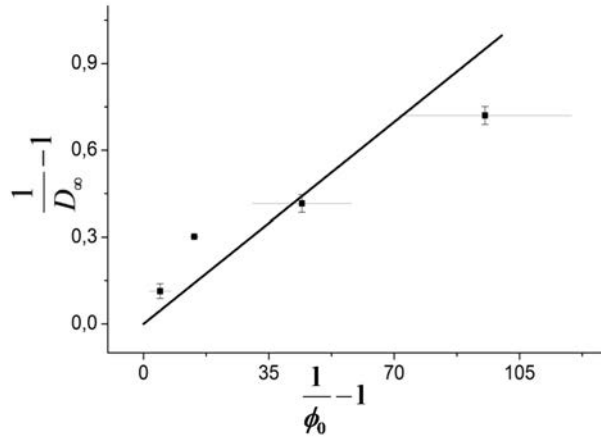


FIGURE 2.20: Evolution de l'inverse de  $D_\infty$  en fonction de l'inverse de  $\phi_0$ , modélisation linéaire correspondante.

De la même manière que précédemment, il apparaît une dépendance linéaire de l'inverse de ce paramètre en fonction du flux de photons incident, dans laquelle on peut insérer l'expression de  $\phi_0$ .

$$\frac{1}{\rho_0} = (F(I) + k_{endo}) \frac{k_{-Q} (k_{-e} + k_{dQ}) + k_{dQ} k_e}{k_Q k_e k_{dQ}} = \frac{k_{endo}}{\phi_0} \frac{k_{-Q} (k_{-e} + k_{dQ}) + k_{dQ} k_e}{k_Q k_e k_{dQ}} \quad (2.44)$$

La courbe correspondante a été tracée en figure 2.21.

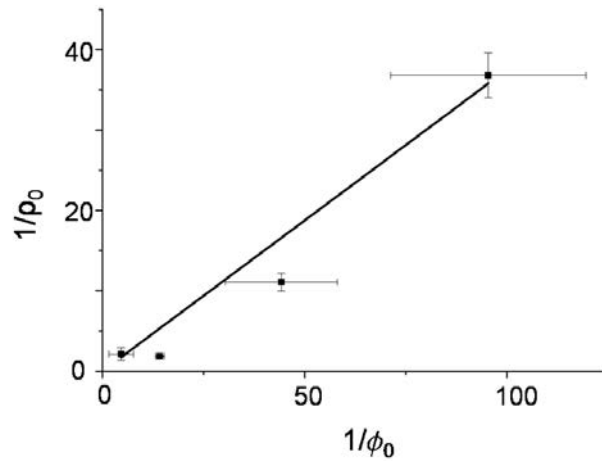


FIGURE 2.21: Evolution de l'inverse de  $\rho_0$  en fonction de l'inverse de  $\phi_0$ , modélisation linéaire correspondante ( $1/\rho_0 = 3,75205 \times 10^{-7}/\phi_0$ ,  $r^2 = 0,987$ ).

L'allure de la courbe à nouveau semble compatible avec le mécanisme envisagé. Néanmoins une forte incertitude sur la mesure de ces paramètres entache les résultats et com-

plique l'analyse. Encore une fois, un plus grand nombre d'intensité lumineuse permettrait de valider définitivement le mécanisme envisagé.

### 2.3.2.1.5 Flux endogène et exogène

La proportion de sites ouverts peut être décomposée en deux parties, celle due au flux endogène et celle due au flux exogène. Par identification dans l'équation (2.37), le flux endogène, noté  $\Xi$ , se calcule ainsi :

$$\Xi = \frac{\phi_0 \frac{D_\infty}{\rho_0}}{\frac{D_\infty}{\rho_0} + C_Q} \quad (2.45)$$

En utilisant les valeurs obtenues précédemment, il est possible de simuler l'évolution du flux endogène en fonction de la concentration en quinone, aux intensités précédemment étudiées, ce qui a été tracé en figure 2.22. Il semble subvenir une incertitude sur la courbe

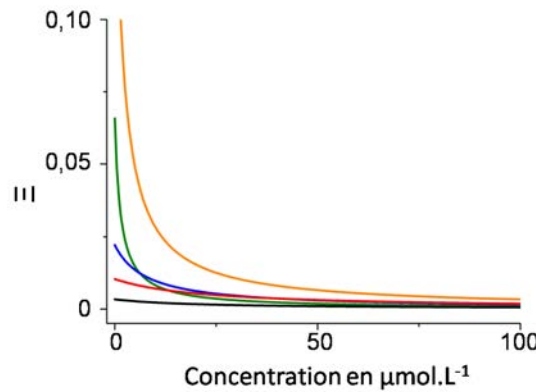


FIGURE 2.22: Evolution de la proportion de sites ouverts par le flux endogène en fonction de la concentration en quinone à différentes intensités lumineuses en  $\mu\text{E}.m^{-2}.s^{-1}$  : 56 (orange), 135 (vert), 340 (bleu), 800 (rouge), 1500 (noir).

à  $135 \text{ E}.m^{-2}.s^{-1}$ , ce qui explique l'allure de la courbe de  $\rho_0$  en fonction de  $\phi_0$ .

Le flux exogène, noté  $\Psi$  se calcule quant à lui par (d'après l'équation (2.37)) :

$$\Psi = \frac{D_\infty C_Q}{\frac{D_\infty}{\rho_0} + C_Q} \quad (2.46)$$

Il peut également être simulé, d'une manière similaire au flux endogène. Les données résultantes ont été tracées en figure 2.23.

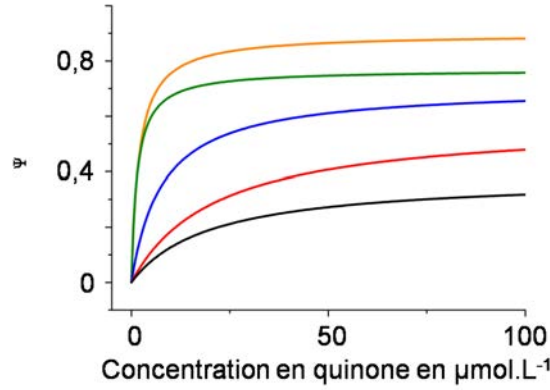


FIGURE 2.23: Evolution de la proportion de sites ouverts par le flux exogène en fonction de la concentration en quinone à différentes intensités lumineuses en  $\mu\text{E}.m^{-2}.s^{-1}$  : 56 (orange), 135 (vert), 340 (bleu), 800 (rouge), 1500 (noir).

Il est donc possible, sur la base d'une modélisation de l'évolution de la proportion de sites ouverts en fonction de la concentration, de discriminer les rendements des flux endogène et exogène.

#### 2.3.2.1.6 Extension et analyse du système

Cette étude, portant sur quelques intensités et quelques concentrations a permis de déterminer l'évolution des différents paramètres intervenant dans le calcul de la proportion de sites ouverts en fonction de l'intensité lumineuse. Ces résultats peuvent dès lors être utilisés pour décrire le système dans des conditions de concentration et d'intensité lumineuse non explorées. Un graphique 3D a ainsi été tracé (figure 2.24), donnant l'évolution de la proportion de sites ouverts sur l'ensemble des gammes de concentration et d'intensité sondées.

L'allure des courbes précédemment obtenues se retrouve de façon prévisible sur ce graphique. Il est également possible d'utiliser les simulations réalisées pour déterminer quelles zones précédemment définies sont rencontrées dans cette étude (figure 2.25).

Aucune des zones exclusivement définies en zone Inverse n'est observée ici. Ceci est cohérent car une hausse de la proportion de sites ouverts en fonction de la concentration en quinone est observée ici. Cela conduit à conclure que  $\beta$  est supérieur à 1, donc  $QQ_A^-$

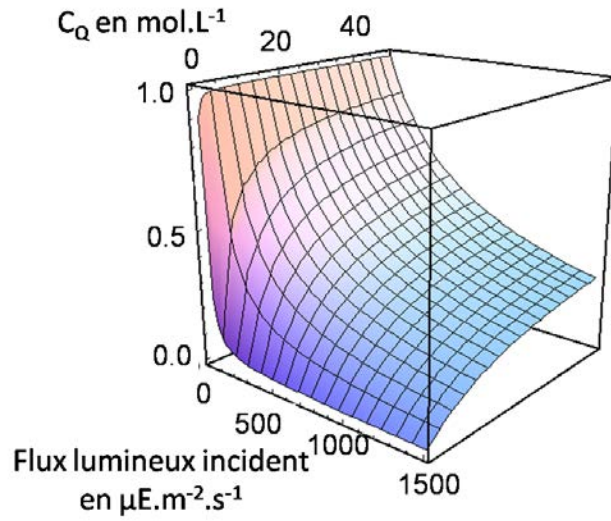


FIGURE 2.24: Graphique 3D représentant l'évolution de la proportion de sites ouverts en fonction de la concentration en quinones et de l'intensité lumineuse, sur une suspension de mutants f1 de *Chlamydomonas reinhardtii* à  $10^7$  cellules par mL.

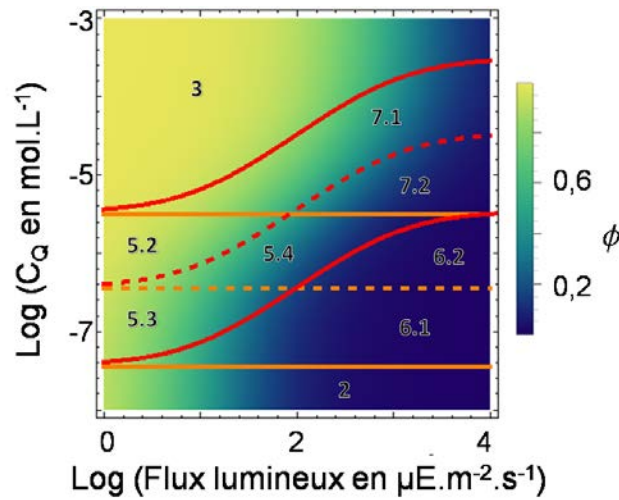


FIGURE 2.25: Diagramme de zones dans le cas d'une suspension de mutants f1 de *Chlamydomonas reinhardtii* en fonction des logarithmes des concentrations et intensités lumineuses, la couleur représentant la proportion de sites ouverts

donne plus vite son électron que  $Q_A^-$ . Toute observation de la zone Inverse est donc exclue ici. Parmi les zones observables en zone Normale, seule la zone 4 ne peut être observée ici. Cela signifie que, dans les conditions étudiées, le flux endogène et la cinétique de transfert d'électrons ne peuvent pas être négligées simultanément, avec une marge de 10%.

Il est intéressant de noter que ces zones peuvent avoir des applications différentes. Ainsi la zone 6 permet l'extraction d'électrons photosynthétiques sans diminuer le flux endogène. Dans un but de limitation de la photoinhibition, la frontière entre les zones 3 et 7 permet, à intensité lumineuse fixée, une proportion de sites ouverts maximale pour une concentration en quinones minimale.

### 2.3.2.1.7 Conclusion

En conclusion, nous avons analysé les résultats expérimentaux à la lumière d'un mécanisme simplifié, inspiré de la littérature. Les courbes  $D_Q = f(C_Q)$  ont été modélisées selon l'équation 2.37. Ceci a permis la mesure des différents paramètres que sont  $\phi_0$ ,  $D_\infty$  et  $\rho_0$ . Nous avons pu montrer que la relation entre ces différents paramètres était cohérente avec le modèle donné.

La connaissance de la variation de ces différents paramètres avec l'intensité lumineuse a permis une extension des résultats, connaissant dès lors la proportion de sites ouverts pour toute concentration et toute intensité, sur la gamme sondée. Cela a permis le tracé d'un graphique tri-dimensionnel, donnant la proportion de sites ouverts en fonction de ces deux paramètres.

Par suite, ces résultats ont également permis le tracé d'un diagramme de zones, permettant de savoir, connaissant la concentration en quinone et l'intensité lumineuse, quel flux dominera la proportion de sites ouverts, ainsi que la nature du phénomène limitant la dérivation électronique. Au bilan, même au sein de la zone Normale, toutes les zones ne peuvent pas forcément être atteintes selon les caractéristiques physico-chimiques du système considéré. Après avoir vu le diagramme de zones du mutant sans  $b_6f$ , il est donc intéressant de considérer le sauvage, c'est à dire le système photosynthétique complet.

### 2.3.2.2 Cas du Sauvage

En premier lieu, il convient de mentionner que sur ce type de souche, le flux endogène est bien plus grand que pour les mutants mis en jeu précédemment. De fait, l'ajout de quinones provoquera intrinsèquement moins de variation de la proportion de sites ouverts que sur un mutant tel que le f1. Il est donc plus délicat d'obtenir une mesure précise des

différents paramètres ce qui perturbe l'allure des courbes. Dans ce contexte, seuls 3 flux lumineux incidents ont pu être étudiés, car l'irradiation se doit alors d'être suffisamment forte pour observer une variation de la proportion de sites ouverts significative.

De plus, il est à noter que l'allure de la courbe d'induction de fluorescence en absence de quinone (figure 2.26) diffère de celle du mutant sans  $b_6f$ . En effet, en absence de quinones, la fluorescence augmente de sa valeur initiale ( $F_0$ ) à une valeur supérieure à la fluorescence stationnaire, due à la réduction de l'accepteur du PSII (ceci supprime de fait une voie de désexcitation concurrentielle donc augmente la fluorescence, comme expliqué précédemment). Ensuite la fluorescence diminue (suite à la mise en route de la chaîne photosynthétique) jusqu'à se stabiliser à une valeur stationnaire. En présence de quinones, la dérivation électronique inhibe la hausse de fluorescence en amont de la fluorescence stationnaire.

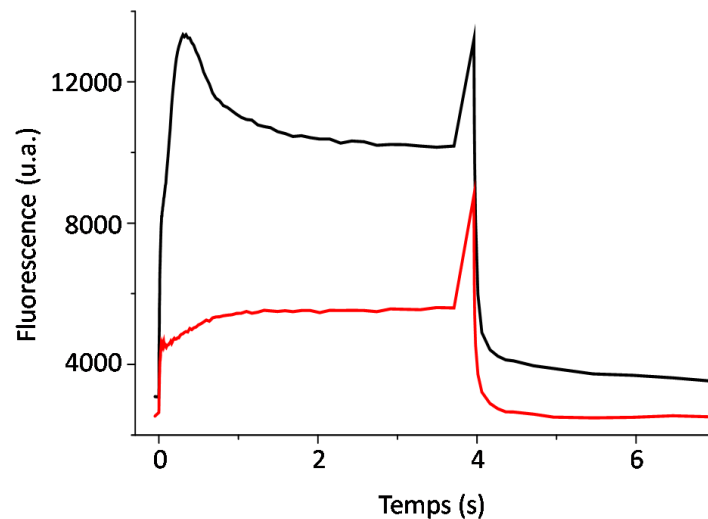


FIGURE 2.26: Allure de la fluorescence en fonction du temps lors de l'irradiation d'un sauvage de *Chlamydomonas reinhardtii* avec un flux de photons incidents de  $800 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$  en absence de quinones (courbe noire) et en présence de 2,6-DCBQ (courbe rouge)

En conséquence, dans le cadre du traitement de données réalisé, les résultats sont à analyser plus qualitativement, en raison du faible nombre de flux lumineux sondés.

#### 2.3.2.2.1 Etude de l'influence de l'intensité lumineuse sur la proportion de sites ouverts en absence de quinones

Comme précédemment, l'évolution de l'inverse de la proportion de sites ouverts en absence de quinone a été tracée (figure 2.27) en fonction du flux lumineux incident.

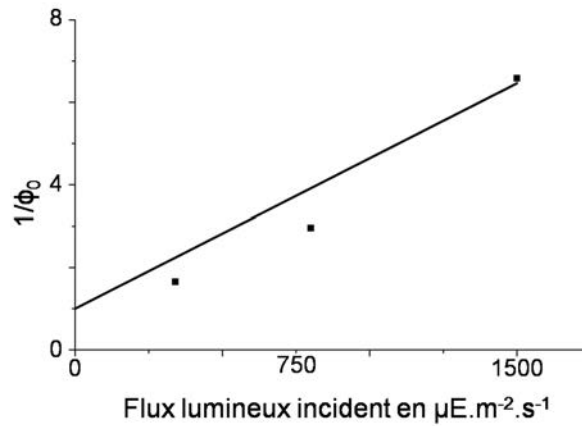


FIGURE 2.27: Evolution de l'inverse de  $\phi_0$  en fonction du flux de photon incident, modélisation par une fonction affine ( $1+0,00364I$ ,  $r^2$  de 0,99)

Comme mentionné plus haut, le relatif faible nombre de points ne permet pas de définir clairement une tendance. Cependant, une modélisation affine de l'évolution de la variation de ce paramètre avec le flux lumineux incident semble décrire relativement correctement les données ( $r^2$  de 0,99) avec une ordonnée à l'origine égale à 1. Il ne semble donc pas apparaître de limitation par la cinétique de transfert d'électron ou d'excitation entre la chlorophylle et  $Q_A$ . En effet, une telle limitation tendrait à saturer l'évolution de l'inverse de  $\phi_0$  aux fortes intensités, ce qui ne semble pas être le cas ici.

#### 2.3.2.2.2 Evolution de la proportion de sites ouverts en fonction de la concentration

La proportion de sites ouverts a été tracée (figure 2.28) en fonction de la concentration en 2,6-DCBQ aux trois mêmes intensités.

A nouveau, la proportion de sites ouverts augmente lorsque l'intensité lumineuse diminue ce qui est cohérent. Les différentes courbes ont été modélisées par la même équation que précédemment 2.37.



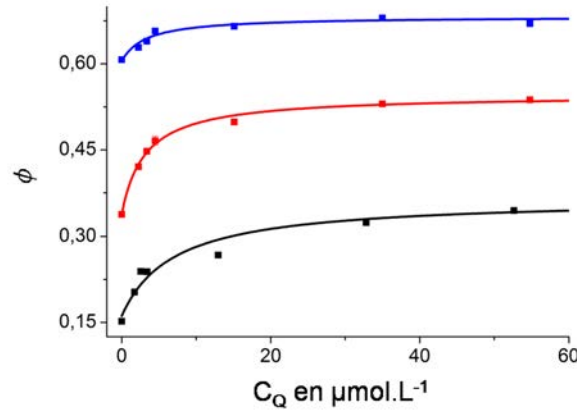


FIGURE 2.28:  $\phi$  en fonction de la concentration en 2,6-DCBQ à différents flux de photons incidents 1500 (noir), 800 (rouge) et 340 (bleu)  $\mu E.m^{-2}.s^{-1}$  (points), ajustements du modèle correspondant (lignes continues, les couleurs correspondant).

$$\phi = \frac{\phi_0 \frac{D_\infty}{\rho_0} + D_\infty C_Q}{\frac{D_\infty}{\rho_0} + C_Q}$$

La méthodologie décrite dans les parties antérieures a été appliquée et permet d'étudier l'évolution de  $D_\infty$  et  $\rho_0$  en fonction de l'intensité lumineuse (tableau 2.4), le même modèle de dérivation électronique que sur le mutant étant considéré.

Intensité lumineuse	$D_\infty$	$\rho_0 10^{-4} (L.mol^{-1})$	$\phi_0$	$r^2$
1500	$0,37 \pm 0,01$	$5,2 \pm 2$	$0,15 \pm 0,001$	0,965
800	$0,52 \pm 0,01$	$17 \pm 2$	$0,34 \pm 0,006$	0,993
340	$0,68 \pm 0,01$	$21 \pm 15$	$0,60 \pm 0,02$	0,833

TABLE 2.3: Tableau récapitulatif des différents paramètres déterminant la proportion de sites ouverts, sur le sauvage.

### 2.3.2.2.3 Influence du flux de photons incident sur la valeur de $D_\infty$

L'évolution de l'inverse du paramètre  $D_\infty$  a été observée en fonction du flux de photons incident, comme précédemment en figure 2.29.

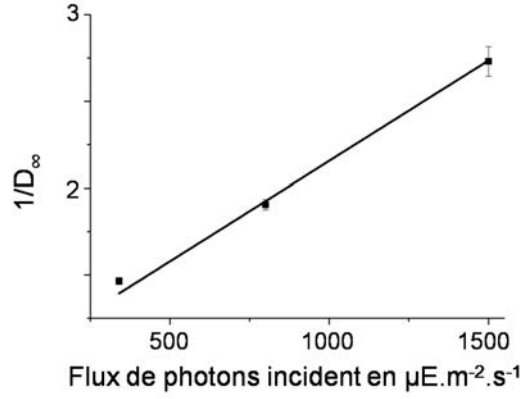


FIGURE 2.29: Evolution de l'inverse de  $D_{\infty}$  en fonction du flux de photon incident en  $E.m^{-2}.s^{-1}$ , simulation linéaire correspondante ( $1+0,00116I$ ,  $r^2 = 0,999$ ).

La courbe obtenue est cohérente avec une évolution linéaire du paramètre en fonction du flux lumineux incident avec une ordonnée à l'origine de 1, tel que montré sur la figure 2.29, malgré le faible nombre de points. Cela permet donc d'estimer la valeur de  $D_{\infty}$  en fonction du flux lumineux.

#### 2.3.2.2.4 Influence du flux de photons incident sur $\rho_0$

L'évolution de l'inverse du paramètre  $\rho_0$  a été observée en fonction de la proportion de sites ouverts, comme précédemment en figure 2.30.

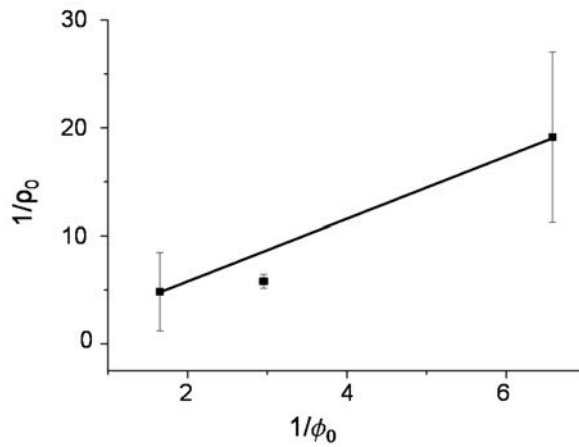


FIGURE 2.30: Evolution de l'inverse de  $\rho_0$  en fonction de la proportion de sites ouverts en absence de quinones, simulation linéaire correspondante (pente  $2,89 * 10^{-6}$ ,  $r^2 = 0,999$ ).

Au vu de l'évolution de la proportion de sites ouverts en absence de quinone, l'imprécision de la courbe est attendue. Cependant, la courbe reste à même d'estimer la valeur de  $\rho_0$  en fonction de l'intensité lumineuse incidente.

### 2.3.2.2.5 Flux endogène et exogène

Comme dans le cas du mutant sans  $b_6f$ , Les paramètres précédemment observés permettent de tracer l'évolution des flux endogène  $\Xi$  (figure : 2.31) et exogène  $\Psi$  (figure : 2.32) en fonction de la concentration aux différentes intensités lumineuses sondées.

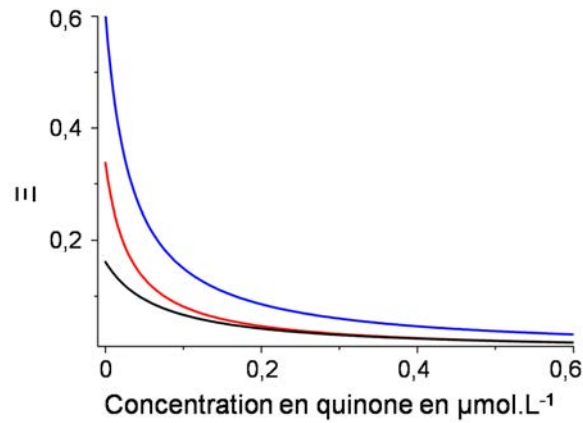


FIGURE 2.31: Proportion de sites ouverts par le flux endogène en fonction de la concentration en 2,6-DCBQ, à des flux de photons incidents (en  $\mu\text{E.m}^2.\text{s}^{-1}$ ) de : 340 (bleu), 800 (rouge), 1500 (noir).

Il est donc possible, sur la base d'expériences de fluorescence, d'estimer et de discriminer les flux endogène et exogène, et ce y compris dans le cas d'un sauvage.

Il est à présent possible de chercher à étendre le système et à discuter des différents domaines de prédominance des différents processus.

### 2.3.2.2.6 Extension et analyse du système

Comme précédemment, les différentes constantes ont permis de généraliser l'évolution de la proportion de sites ouverts en fonction de la concentration et de l'intensité lumineuse. Il est donc possible de prévoir la proportion de sites ouverts connaissant la concentration

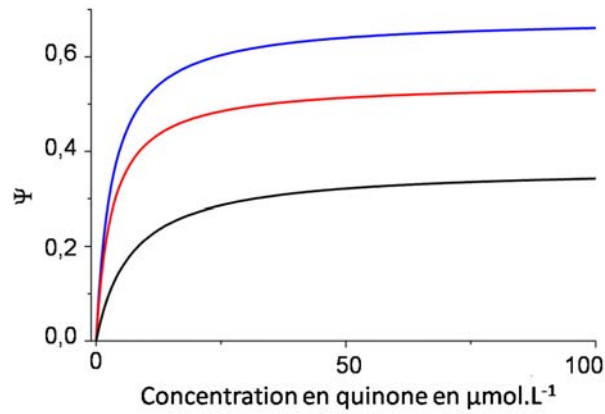


FIGURE 2.32: Proportion de sites ouverts par le flux exogène en fonction de la concentration en 2,6-DCBQ, à des flux de photons incidents (en  $\mu\text{E.m}^2.\text{s}^{-1}$ ) de : 340 (bleu), 800 (rouge), 1500 (noir).

et l'intensité lumineuse 2.33.

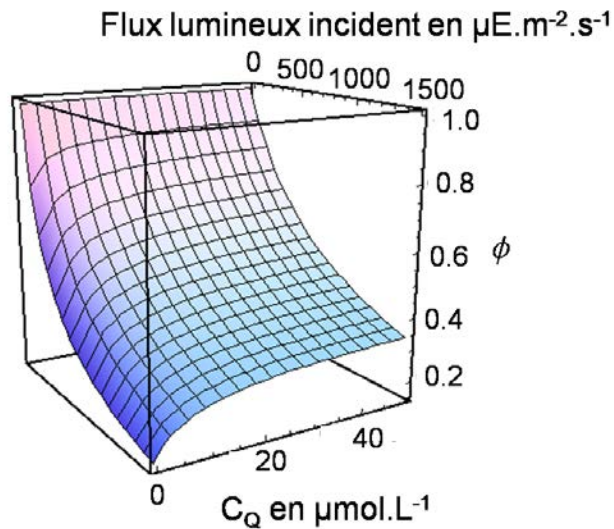


FIGURE 2.33: Graphique 3D représentant l'évolution de la proportion de sites ouverts en fonction de la concentration en quinones et de l'intensité lumineuse, sur une suspension de sauvages de *Chlamydomonas reinhardtii* à  $10^7$  cellules par mL.

On peut ensuite chercher à déterminer quelles sont les zones précédemment décrites accessibles expérimentalement pour un tel système (figure 2.34).

Il apparaît que la zone 2 est toujours difficile à atteindre expérimentalement car elle nécessite des concentrations largement submicromolaires. La sensibilité du système serait

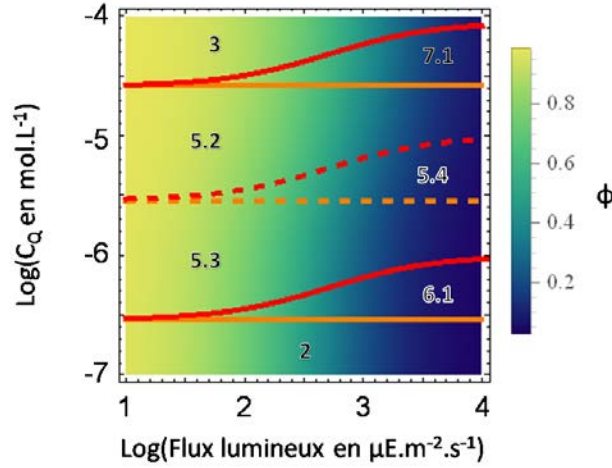


FIGURE 2.34: Diagramme de zones dans le cas d'une suspension de mutants sauvages de *Chlamydomonas reinhardtii* en fonction des logarithmes des concentrations et intensités lumineuses, la couleur représentant la proportion de sites ouverts.

insuffisante pour détecter des variations de signal induites par des variations de concentration de cet ordre de grandeur. L'indépendance de la proportion de sites ouverts en fonction de la concentration est donc difficile à vérifier.

La zone 6 (vitesse de transfert d'électrons négligeable) est toujours présente, mais limitée à la zone 6.1 dans laquelle le flux endogène est dominant.

La zone 5 est toujours observée avec les mêmes sous-domaines que dans le cas des cellules fl. Toutefois, le domaine 5.4 (flux exogène dominant et relativement peu limité par la cinétique de transfert d'électrons) est réduit au profit des domaines 5.2 (flux exogène dominant et limité par la vitesse de transfert d'électrons) et 5.3 (flux endogène dominant, l'exogène étant limité par l'arrivée de la quinone). Ces domaines existent à présent à forte intensité lumineuse, ce qui n'était pas le cas précédemment.

La zone 7 (flux endogène négligeable) est limitée à la zone 7.1 (flux exogène principalement limité par le transfert d'électrons). La zone 4 n'est donc toujours pas observée expérimentalement.

En revanche la zone 3 est toujours observée, ce qui est attendu car elle correspond à un domaine caractérisé par une concentration élevée de quinones ajoutées.

## 2.4 Etude de l'évolution temporelle du système

### 2.4.1 Démonstration

L'expression de la variation de la concentration en quinone en fonction du temps s'exprime selon :

$$\frac{dC_Q}{dt} = -\frac{v_{max}}{V} \frac{D_\infty \rho_0 C_Q}{D_\infty + \rho_0 C_Q} \quad (2.47)$$

Avec  $C_Q$  la concentration en forme quinone,  $t$  le temps,  $v_{max}$  la vitesse photochimique maximale (divisée par 2 pour prendre en compte le fait que deux électrons sont nécessaires pour réduire une benzoquinone),  $V$  le volume de l'échantillon,  $D_\infty$  et  $\rho_0$  les constantes caractéristiques de la capacité du médiateur à dériver les électrons précédemment décrites. En introduisant  $o$  la proportion de quinone sous la forme oxydée et  $C$  la concentration totale en quinone, il advient :

$$C \frac{do}{dt} = -\frac{v_{max}}{V} \frac{D_\infty \rho_0 o C}{D_\infty + \rho_0 o C} \quad (2.48)$$

En simplifiant par  $C$ , en multipliant par  $C_0$  une concentration de référence constante arbitraire, l'équation se réarrange selon :

$$\frac{VC_0}{v_{max}} \frac{do}{dt} = -\frac{D_\infty \rho_0 o C_0}{D_\infty + \rho_0 C_0 o C / C_0} \quad (2.49)$$

Il est alors possible de simplifier l'écriture en introduisant des paramètres adimensionnels  $\tau$  représentant le temps normalisé par la durée nécessaire à la réduction d'une concentration  $C_0$  de benzoquinone dans un volume  $V$  et à une vitesse  $v_{max}$ ,  $\sigma$  et  $\zeta$  respectivement égaux à  $\rho_0 C_0$  et  $\frac{\rho_0 C_0}{D_\infty}$  et  $f$  la concentration en benzoquinone normalisée par  $C_0$  :

$$\frac{do}{d\tau} = -\frac{\sigma o}{1 + \zeta o f} \quad (2.50)$$

Ce qui peut s'écrire ainsi :

$$\frac{1 + \zeta o f}{\sigma o} do = -d\tau \quad (2.51)$$

Ce qui, par intégration de  $o$  entre 1 et  $o$  et de  $\tau$  entre 0 et  $\tau$ , conduit à :

$$\ln(o) + \zeta f o = \zeta f - \sigma \tau \quad (2.52)$$

A partir de cette équation, la variable  $o$  peut s'exprimer selon :

$$o = \frac{\text{ProductLog}[\zeta e^{\zeta f - \sigma \tau} f]}{\zeta f} \quad (2.53)$$

La fonction ProductLog étant la fonction  $w$  solution de l'équation  $z = we^w$  dont l'allure est représentée en figure 2.35 :

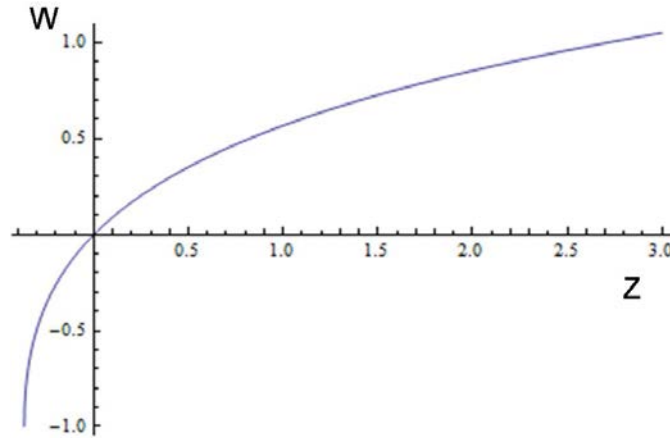


FIGURE 2.35: Allure de la fonction ProductLog

## 2.4.2 Simulations et Résultats

L'évolution de  $o$  au cours du temps a été tracée en utilisant le logiciel de calcul formel Mathématique. Les valeurs de  $a$  et  $b$  ont été prises respectivement de 17085 et 36315 L/mol (cohérente avec le cas de la PPBQ), une concentration de référence de  $1.10^{-6}$  mol/L a été choisie. Cela conduit à l'équation :

$$o = \frac{27.5362 \text{ProductLog}[0.0363158e^{0.0363158f-0.0170848\tau} f]}{f} \quad (2.54)$$

Les résultats sont représentés en figure 2.36.

En effet, la proportion de quinones sous forme oxydée diminue au cours du temps à cause de la photoréduction des quinones jusqu'à consommation totale de ces dernières. Plus les quinones seront initialement concentrées plus leur consommation sera lente car le  $t_{1/2}$  est indépendant de la concentration pour une réaction d'ordre 1 et proportionnel à la concentration pour une réaction d'ordre 0. Il n'est ici pas possible de définir l'ordre de la réaction, mais cela revient cinétiquement à un ordre compris entre 0 et 1 (0 aux temps courts si la quinone est suffisamment concentrée et 1 pour un  $of$  négligeable devant  $\frac{1}{\beta}$ ). Cela explique que le temps de demi-vie augmente avec la concentration sans lui être

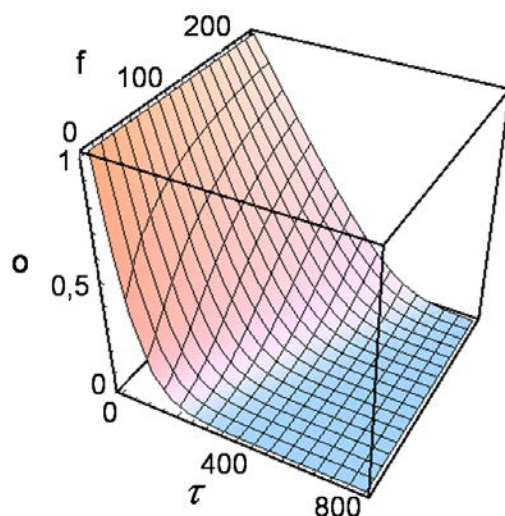


FIGURE 2.36: Proportion de quinones sous leur forme oxydée en fonction du temps et de la concentration en quinone normalisée.

proportionnel. Si l'on considère une valeur de  $v_{max}$  de l'ordre de  $10 \text{ nmole.s}^{-1}$ <sup>3</sup> et un volume de 16 mL, le facteur  $\frac{VC_0}{v_{max}}$  vaut 1,6 s. Dans ces conditions, le temps en s sera donc de même ordre de grandeur que les valeurs de  $\tau$ .

## 2.5 Discussion

Il est observable, en premier lieu, que des valeurs de  $D_\infty$  similaires ont été observées dans le cas du sauvage et des cellules fl. Cela est tout à fait logique car la mutation affecte le flux endogène, qui tend vers 0 dans les deux cas lorsque la concentration en quinone devient grande. Il reste toutefois délicat de comparer plus précisément des grandeurs sur des souches différentes. En effet lorsqu'une mutation est effectuée, des bouleversements annexes dans la cellule peuvent se produire, ce qui peut affecter légèrement certaines constantes de vitesse.

Les valeurs des constantes photosynthétiques obtenues peuvent être comparées aux potentiels rédox des quinones à travers les valeurs de potentiels de demi-vague ( $E_{1/2}$ )

---

3. Si un flux de photons incident de  $340 \text{ E.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  est considéré, la vitesse photochimique classique est de l'ordre d'un photon toutes les 5 à 6 ms par centre, soit environ 200 photons par seconde et par centre. Si la concentration de centres est de l'ordre de 50 nmoles de centre par litre, en considérant que le faisceau irradie un mL de solution, la valeur de 10 nmole de photons par s est bien obtenue.



obtenues lors des études du chapitre 3 (tableau 2.4).

Médiateur	K'	$D_\infty$	$\rho_0 L \cdot \mu mol^{-1}$	$E_{1/2} (mV/ECS)$
2,6-DCBQ	$(1,84 \pm 0,08)10^4$	$0,58 \pm 0,06$	$(4,1 \pm 1,4)10^{-2}$	+42
2,5-DCBQ	$(2,28 \pm 0,40)10^4$	$0,60 \pm 0,08$	$(5,9 \pm 0,5)10^{-2}$	+55
2,6-DMBQ	$(0,37 \pm 0,04)10^4$	nd	$(9,5 \pm 1,2)10^{-4}$	-60
2,5-DMBQ	$(0,45 \pm 0,06)10^4$	nd	$(7,4 \pm 1,4)10^{-4}$	8
PPBQ	$(2,37 \pm 0,19)10^4$	$0,48 \pm 0,01$	$(1,7 \pm 0,1)10^{-2}$	4
BQ	$(0,1 \pm 0,01)10^4$	nd	$(8,1 \pm 1,6)10^{-4}$	-130
NBQ	$(4,93 \pm 0,52)10^4$	$0,10 \pm 0,03$	$(4,0 \pm 1,4)10^{-3}$	-330

TABLE 2.4: Tableau récapitulatif des différentes constantes de quenching, partition dérivation électronique et potentiels de demi-vague à  $340 \mu E \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$ .

Une tendance semble apparaître à travers les valeurs de ce tableau. En effet, la valeur de  $D_\infty$  rend compte, à un flux lumineux incident donné, de la vitesse du transfert d'électron entre  $Q_A^-$  et une quinone exogène localisée dans la poche  $Q_B$ . Or il apparaît que ces valeurs augmentent avec le  $E_{1/2}$ . Cette évolution semblerait donc cohérente avec la région normale de la théorie de Marcus, comme le montre la figure 2.37<sup>4</sup>.

La tendance semblerait donc montrer un contrôle par la cinétique du transfert d'électrons, car la cinétique par laquelle la quinone exogène quitte la poche  $Q_B$  n'est pas fonction du potentiel standard et donc n'est pas susceptible d'expliquer la corrélation. Il est néanmoins délicat de pousser plus avant l'analyse d'un point de vue plus quantitatif. En effet, la variation de  $D_\infty$  avec le potentiel standard des quinones met en jeu différents paramètres (cinétique par laquelle la quinone exogène quitte la poche  $Q_B$ , énergie de réorganisation...) qui sont inconnus. L'addition des inconnues et le faible nombre de points rend donc difficile toute analyse quantitative.

Il est également possible de réinterpréter les résultats observés expérimentalement à la lumière des diagrammes de zones élaborés. Les deux DCBQ et la PPBQ présentent en effet

---

4. Une loi linéaire est utilisée pour décrire la loi de Marcus (domaine dans lequel la constante de vitesse de la réaction augmente avec sa force motrice), cohérente avec un fonctionnement dans la région normale pour une valeur de  $\frac{\Delta G}{\lambda}$  négligeable devant 2. En effet, la seule tendance qui pourrait être visible sur le graphique n'est pas cohérente avec le modèle de Marcus, et insuffisante pour invalider le modèle.

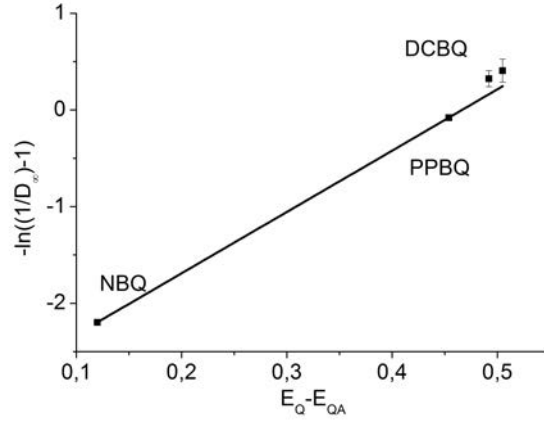


FIGURE 2.37: Evolution de  $-\ln((1/D_\infty) - 1)$  en fonction de la différence de potentiel de demi-vague entre la quinone exogène et l'accepteur d'électron  $Q_A$ , modélisation par une loi linéaire ( $r^2 = 0,9993$ ).

des comportements similaires. Néanmoins, le fait qu'aucune saturation ne soit observée dans le cas des DMBQ et de la BQ signifie que, sur l'ensemble de la gamme étudiée,  $\alpha < \beta$ , et donc seules les zones 2, 6 et 4 ont pu être observées. Cela signifie donc que l'influence de la cinétique de transfert d'électrons reste négligeable dans ces conditions. Cela peut s'expliquer par des difficultés de la quinone pour accéder au site  $Q_B$  comme en témoignent les faibles valeurs de  $\rho_0$ . Ceci est également corrélé qualitativement aux valeurs de constantes de quenching  $K'$ , en effet les quinones avec des faibles valeurs de  $\rho_0$  correspondent à des faibles valeurs  $K'$ . En effet la constante de quenching  $K'$  est également dépendante de la capacité de la quinone à accéder à la membrane thylacoïde. Là encore il n'est cependant pas possible d'effectuer une comparaison plus quantitative. En effet, les valeurs de  $\rho_0$  dépendent également d'autres paramètres dont la cinétique de transfert d'électrons, susceptible de varier d'une quinone à une autre. De plus,  $K'$  dépend aussi de la constante de quenching réelle  $K$  (à appliquer à la concentration dans la membrane thylacoïde) qui est inconnue. Enfin, le quenching ne se produit pas depuis la poche  $Q_B$ , la cinétique d'accessibilité est donc potentiellement différente.

Il est à noter que les différentes zones du diagramme ouvrent des applications différentes. Ainsi, par exemple, une application énergétique sur le long terme (extraction de photocourant sans trop diminuer le flux d'électrons arrivant au niveau du PSI) pourrait être intéressante sur la base des zones 2, 4 et 6. En effet, l'absence de limitation par le

transfert d'électron se traduit par le fait que le flux exogène se traduit uniquement par une hausse de la proportion de sites ouverts, et non par une baisse du flux endogène. En revanche, la proportion de sites ouverts est plus faible que celle observée en zone 3, par exemple. Cette dernière serait donc plus intéressante dans un objectif de prévention de la photoinhibition. *Le diagramme de zones est donc un outil qui peut aider à déterminer les conditions optimales à utiliser, en fonction de l'objectif.*

Il est à noter que cette étude, tant pour les diagrammes de zones que pour l'évolution temporelle, ne prend pas en compte la photoinhibition. Ce phénomène serait à prendre en compte dans le cas d'applications sur le long terme, qu'elles soient énergétiques ou biologiques.

## 2.6 Conclusion

Au terme de cette partie, des mesures de fluorescence ont permis d'évaluer la capacité de différentes quinones exogènes à dériver les électrons photosynthétiques à l'échelle d'une population d'algues unicellulaires. Il en ressort notamment une "perte" d'une partie de ces quinones pour la dérivation, attribuée à un phénomène de partition des quinones.

L'évolution de cette capacité à dériver les électrons photosynthétiques en fonction de la concentration en quinones et de l'intensité lumineuse a pu être rationalisée sur sauvage et sur mutant  $\Delta b_6f$ . Le mécanisme étant en plusieurs étapes, les conditions expérimentales pour lesquelles une ou plusieurs étapes clés sont limitantes ont été établies. Ceci pourrait permettre d'optimiser les conditions expérimentales en fonction de l'objectif souhaité.

Enfin, la gamme de temps au bout de laquelle la réduction des quinones devient significative a été estimée en fonction des différentes conditions expérimentales. Dans le cadre de ce travail, il s'agit désormais de s'intéresser à la régénération de la forme oxydée de la quinone par voie électrochimique, ce qui pourrait permettre de travailler sur une gamme de temps plus longue.



# Chapitre 3

## Etude du comportement électrochimique des composés de type quinone en milieu aqueux

### 3.1 Bibliographie générale sur le couple benzoquinone / hydroquinone

#### 3.1.1 Généralités

Le couple benzoquinone/hydroquinone est un couple rédox particulièrement courant dans le domaine de l'électrochimie. Sa structure est représentée en figure 3.1.

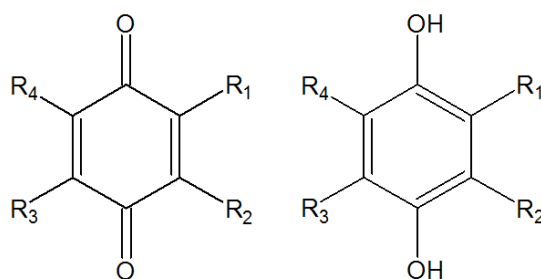


FIGURE 3.1: Schéma de la structure de type benzoquinone ( $Q$ , à gauche) et hydroquinone ( $QH_2$ ) à droite

Des molécules de ce type font en effet l'objet de nombreuses études au sein de la

littérature électrochimique, que ce soit au travers de biocapteurs, (tels que des biocapteurs à acides nucléiques [114–122]) ou encore via la réalisation de transferts d’électrons médiés [123–125].

Néanmoins, dans ces études, les quinones sont utilisées comme de simples outils. Le comportement électrochimique des quinones n’y est pas nécessairement étudié en détail, en particulier en ce qui concerne les milieux aqueux. Afin de comprendre la complexité de ce comportement électrochimique, il est nécessaire d’explicitier la nature du couple mis en jeu. A titre d’exemple, il a été observé que la cinétique de transfert d’électron de la benzoquinone dépend de la nature de la surface de l’électrode [126], ce qui semble indiquer, dans ce cas, un transfert d’électron se produisant selon un mécanisme en sphère interne.

Nous nous focaliserons ici uniquement sur le cas des milieux aqueux. Globalement, la demi-équation électronique, en milieu protique, s’écrit :



Il s’agit donc d’un transfert de deux électrons et de deux protons. Ceci implique que le comportement dépende fortement du pH et soit d’une certaine complexité (transferts de deux électrons en plus de deux étapes chimiques). Cela a été bien étudié par Laviron dans les années 80.

### 3.1.2 Transferts d’électrons et de protons : modèle de Laviron

Comme il a été dit précédemment, la réaction nécessite le passage de deux électrons et de deux protons. L’ordre dans lequel ces deux électrons et protons sont transférés dépend des conditions de pH et de la cinétique du transfert d’électron entre la quinone et l’électrode. Un outil de description de ce mécanisme a été développé par Laviron dans les années 80 et est appelé schéma carré [127–134].

#### 3.1.2.1 Schéma carré à 4 espèces

Le plus simple des couples mettant en jeu des transferts d’électrons et de protons est constitué du transfert d’un électron et d’un proton. C’est le premier système décrit par Laviron, permettant l’invention du schéma carré à 4 [132].

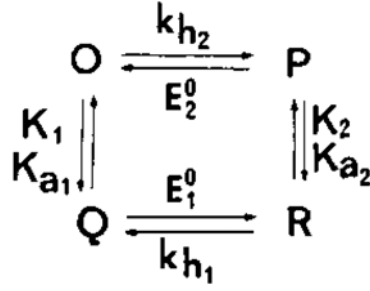


FIGURE 3.2: Représentation générale d'un schéma à 4 dans le cas du transfert d'un électron et d'un proton, avec  $kh_2$  et  $kh_1$  des constantes de vitesse de transferts d'électron interfaciaux,  $E_2$  et  $E_1$  les potentiels standards associés,  $K_1$  et  $K_2$  des constantes d'équilibre de réaction en phase homogène notables  $K_a$  dans le cas de réactions acido-basiques [132].

Une simple application de la loi de Nernst et de la loi d'action de masse permet de tracer le diagramme potentiel-pH décrivant les domaines de prédominance de ces différentes espèces (figure 3.3).

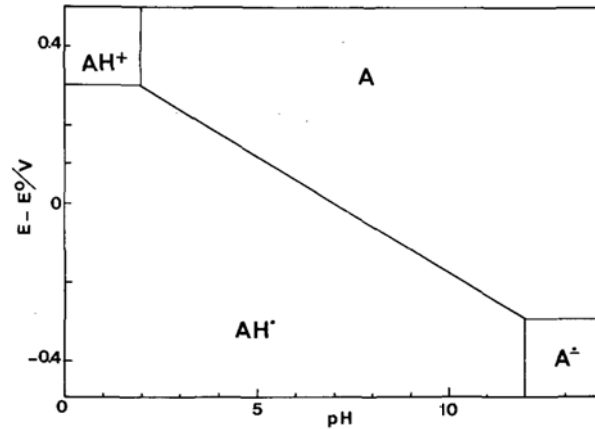


FIGURE 3.3: Diagramme potentiel pH pour un schéma carré à 4 avec  $pK_{a1} = 2$  et  $pK_{a2} = 12$  [134].

La prédominance d'une espèce par rapport à une autre, dans des conditions expérimentales données, influe logiquement sur la séquence réactionnelle. Cependant d'autres paramètres comme les cinétiques de transfert d'électrons sont également à considérer. Ainsi, les différentes constantes exprimées 3.2 permettent de calculer le rapport des courants qui passent par « le haut » et « le bas » du schéma. Si  $i_1$  désigne le courant qui passe par « en bas » et  $i_2$  celui qui passe par en haut, le rapport des deux peut s'exprimer :

$$\frac{i_1}{i_2} = \frac{k_{h1}}{k_{h2}} \frac{c_{H^+}}{\sqrt{K_{a1}K_{a2}}} \quad (3.2)$$

La combinaison de cette formule avec le diagramme de stabilité permet d'extraire le diagramme de prédominance des différentes séquences réactionnelles (figure 3.4).

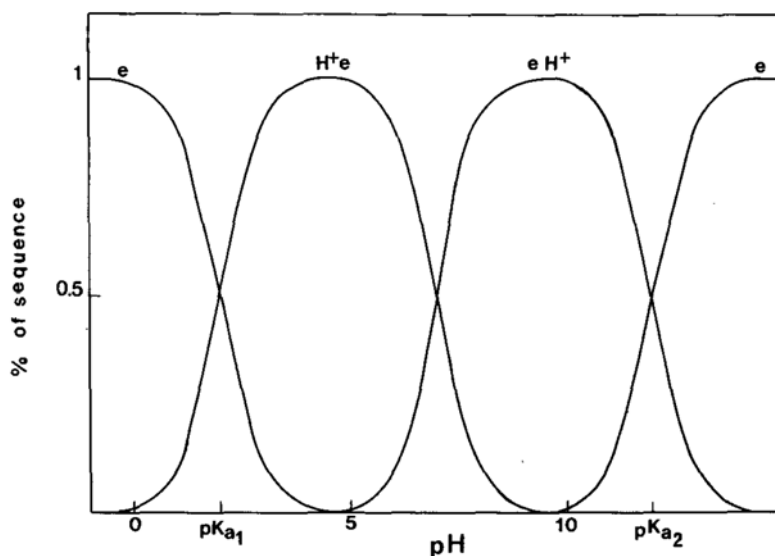


FIGURE 3.4: Diagramme de prédominance des différentes séquences en fonction du pH, dans le cas où les constantes de vitesses de transfert d'électron sont égales [134].

### 3.1.2.2 Schéma en échelle à 6 espèces

Ce type de schéma, dit en échelle (figure 3.5), permet entre autres d'introduire les différentes constantes thermodynamiques (acido-basiques et d'oxydo-réduction) et cinétiques. Le cas général des schémas en échelle à 6 est représenté (figure 3.5a), ainsi que son application au cas du transfert d'un électron et d'un proton (figure 3.5b).

D'une manière similaire au cas précédent, on s'attend à ce que les conditions expérimentales jouent sur la prédominance de l'une ou l'autre de ces espèces. Des diagrammes de Pourbaix théoriques ont pu être tracés. Par ailleurs, la nature de l'espèce dominante dépend logiquement du potentiel et du pH. Les frontières présentes dépendent quant à elles des valeurs relatives des pKa par rapport aux potentiels standards. Au sein de la figure 3.6, le potentiel est tracé en prenant la différence par rapport au potentiel standard du couple O/P (figure 3.5a) ou du couple  $AH^+/AH^\cdot$  (figure 3.5b). Néanmoins, il est à noter qu'un potentiel standard du couple global aurait pu être exprimé. (En effet la variation d'enthalpie libre au cours de la réaction peut être décomposée selon la loi de Hess, ce qui permet l'obtention d'un potentiel standard.)



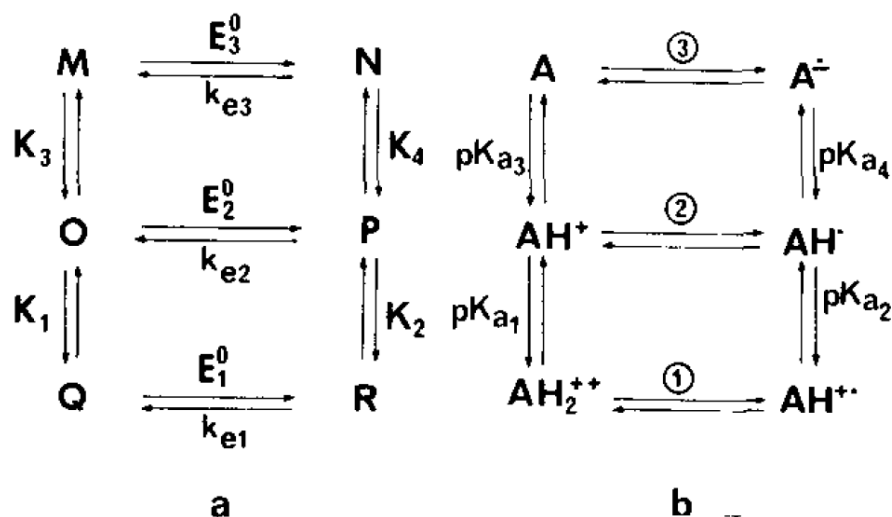


FIGURE 3.5: Schéma en échelle, représentation générale à gauche (1 électron, deux étapes chimiques non précisées), application au cas du transfert d'un électron et de deux protons à droite [130].

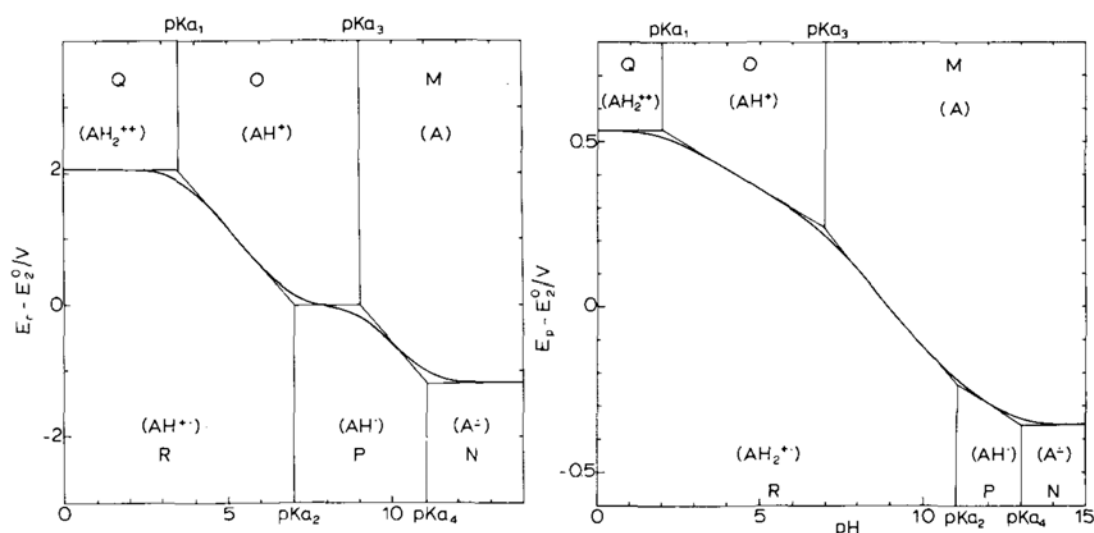


FIGURE 3.6: Diagramme de Pourbaix théoriques obtenus dans le cadre d'un schéma en échelle (transfert d'un électron et de deux protons), à gauche cas où  $pK_{a2} < pK_{a3}$ , à droite cas où  $pK_{a3} < pK_{a2}$  [130].

Comme dans le cas du schéma carré à 4, la valeur du pH influe sur les proportions de chaque espèce, modifiant de fait la séquence réactionnelle. Le passage de M à R, par exemple de A à  $AH_2^{++}$ , nécessite donc le transfert d'un électron et de deux protons. En considérant le schéma général, trois chemins réactionnels possibles se dégagent donc :





La discrimination entre les différentes voies réactionnelles dépend du pH par rapport aux valeurs de pKa et du potentiel, mais également des cinétiques des différents transferts d'électrons, donc de la nature de la surface de l'électrode. Selon le pH, les formes M et R peuvent ne pas être les seules présentes en solution. Cela peut provoquer une multiplication des séquences réactionnelles envisageables. Néanmoins, les proportions de courants qui passent par les différents couples rédox mentionnés au préalable peuvent être calculées :

$$\frac{i_1}{i} = \frac{x}{1 + x + y} \quad (3.6)$$

$$\frac{i_2}{i} = \frac{1}{1 + x + y} \quad (3.7)$$

$$\frac{i_3}{i} = \frac{y}{1 + x + y} \quad (3.8)$$

Avec :

$$x = \frac{k_{e1}}{k_{e2}} \frac{c_{H^+}}{\sqrt{K_{a1}K_{a2}}} \quad (3.9)$$

$$y = \frac{k_{e3}}{k_{e2}} \frac{c_{H^+}}{\sqrt{K_{a3}K_{a4}}} \quad (3.10)$$

En utilisant ces relations et en utilisant la loi d'action de masse pour calculer les proportions de chaque espèce acido-basique présente, une étude des différents mécanismes possibles a pu être réalisée. Un diagramme récapitulant la prédominance des différentes séquences réactionnelles est tracé en fonction du pH (figure 3.7), pour un exemple pris tel que  $pK_{a1} < pK_{a2} < pK_{a3} < pK_{a4}$  et en considérant que les cinétiques de transfert d'électron sont égales. Cependant, le cas des couples quinones/hydroquinones en milieux aqueux gagne encore en complexité en comparaison des schémas à 4 et 6 espèces. En effet, le couple implique, comme dit précédemment, le transfert de deux électrons et de deux protons, ce qui démultiplie encore les chemins possibles dans la suite réactionnelle.

### 3.1.2.3 Schéma carré à 9 espèces

Les quinones, correspondent à des systèmes constitués du transfert de deux électrons et de deux protons. La prise en compte des différents transferts électroniques et échanges de proton peut être concrètement décrite par un schéma carré à 9 espèces (figure 3.8).

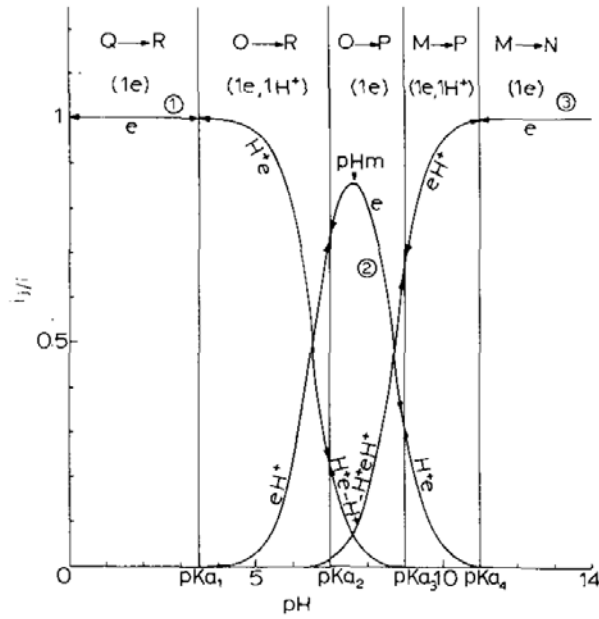


FIGURE 3.7: Diagrammes de prédominance des différentes séquences réactionnelles envisageables en fonction du pH, le bilan majoritaire de la réaction étant précisé en haut du graphe pour chaque tranche de pH, et la nature du transfert d'électron occasionné numéroté [130].

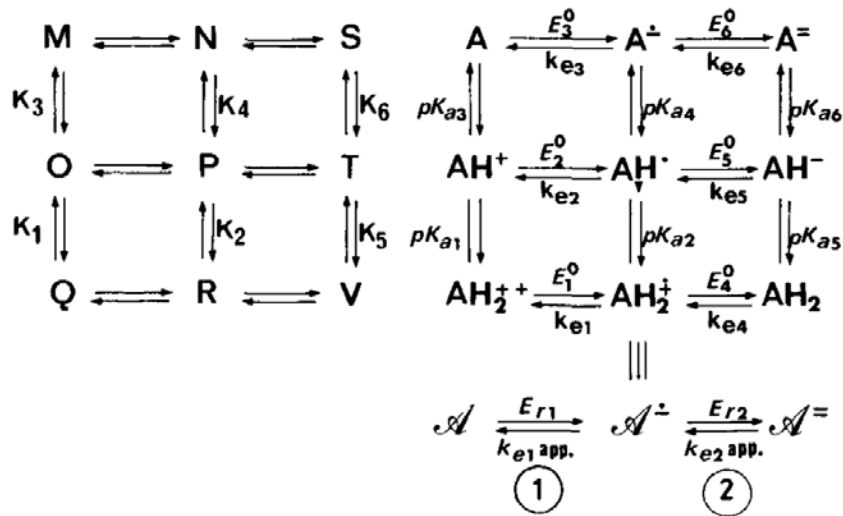


FIGURE 3.8: Représentation générale d'un schéma carré à 9 espèces à gauche, application au cas du transfert de deux électrons et de deux protons [131].

De la même manière que précédemment, des diagrammes de prédominance des différentes espèces ont pu être tracés en fonction du potentiel et du pH. Selon les valeurs des différentes constantes thermodynamiques, certaines transformations peuvent être favorisées ou non. La figure 3.9 donne un exemple de diagramme dans des conditions telles que

$$E_2 - E_5 > 2.3RT/F(pKa_5 - pKa_3).$$

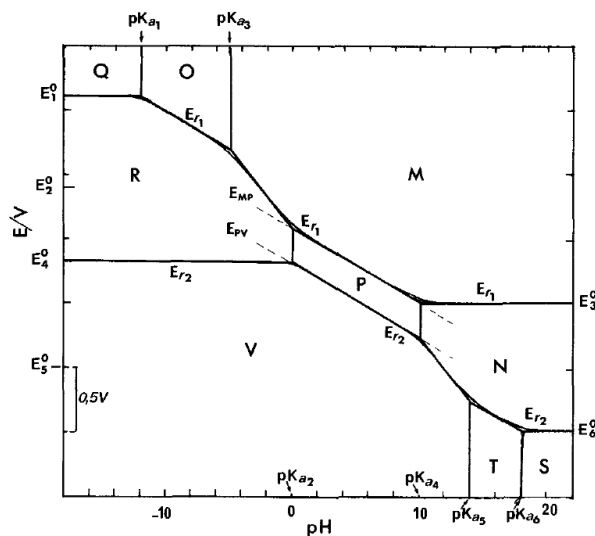


FIGURE 3.9: Exemple de diagramme de prédominance dans le cadre d'un schéma carré à 9 espèces, cas dans lequel  $E_2 - E_5 = 1,4V > 2.3RT/F(pKa_5 - pKa_3)$ , les valeurs de pKa étant représentées sur la figure [131].

Dans de telles conditions, aucun transfert bi-électronique direct n'est possible. Un passage par la forme semi-quinone est obligatoire.

Le même diagramme, tracé avec  $E_2 - E_5 < 2.3RT/F(pKa_5 - pKa_3)$ , toutes les autres constantes étant identiques, est représenté en figure 3.10. De telles conditions ne permettent pas la stabilisation de la forme semi-quinone neutre. Une transition directe de M à V (soit de A à  $AH_2$ ), soit le passage de 2 électrons et de 2 protons, est alors possible.

Si d'autres valeurs des différentes constantes sont considérées (figure 3.11), d'autres transitions peuvent apparaître. Par exemple, des transitions directes de O à V (soit de  $AH^+$  à  $AH_2$ ) (2 électrons et 1 proton), de M à V (soit de A à  $AH_2$ ) (2 électrons et deux protons) et de M à T (soit de A à  $AH^-$ ) (2 électrons et 1 proton, contrairement à ce qui est indiqué sur la figure) sont envisageables selon la valeur du pH.

En corrélant ce diagramme de prédominance avec la cinétique de transfert d'électrons comme dans le cas des schémas à 4 et à 6, la comparaison des différentes séquences réactionnelles en fonction du pH peut être établie (figure 3.12).

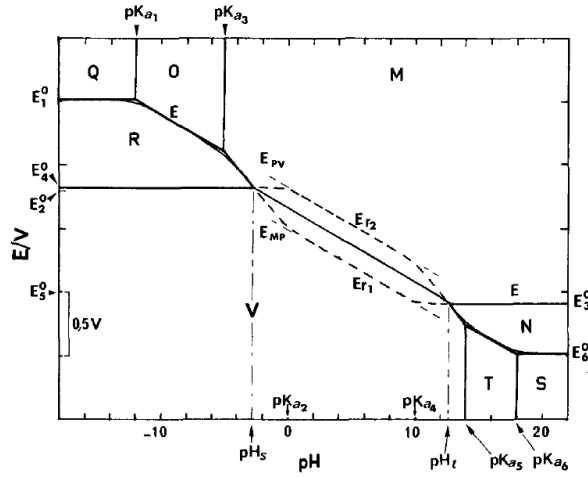


FIGURE 3.10: Diagramme potentiel pH d'un schéma à 9 avec des constantes identiques à celles de la figure précédente, sauf  $E_2 - E_5 = 0,8V < 2.3RT/F(pKa_5 - pKa_3)$  [131].

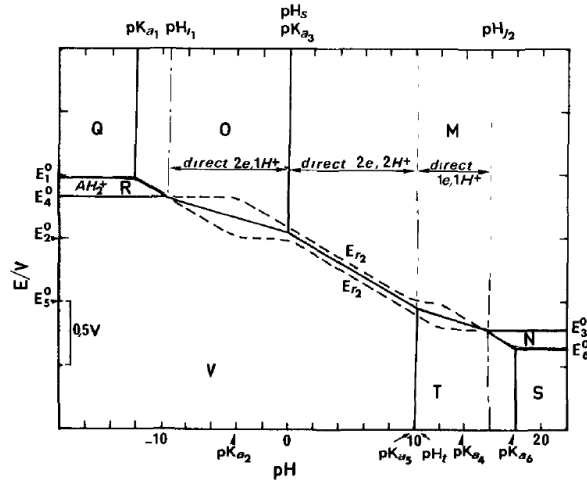


FIGURE 3.11: Autre exemple de diagramme de prédominance dans le cadre d'un schéma carré à 9 espèces, cas dans lequel  $E_2 - E_5 = 1,4V > 2.3RT/F(pKa_5 - pKa_3)$ , les nouvelles valeurs de pKa étant représentées sur la figure. [131]

### 3.1.2.4 Conclusion et remise en contexte

Il a été vu que le modèle de Laviron pouvait permettre de décrire le comportement électrochimique des quinones par le biais du schéma carré à 9 espèces. Néanmoins, différentes limitations demeurent quant à son usage répétitif sur plusieurs quinones données.

- La détermination d'un mécanisme par cette méthode nécessite la connaissance des différentes valeurs de pKa, de potentiels standards et de constantes de vitesse de transfert d'électrons. Or ces grandeurs ne sont pas toutes aisément mesurables, dû à

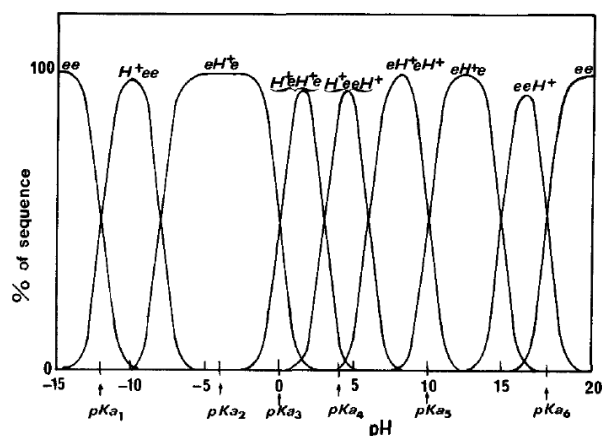


FIGURE 3.12: Exemple de diagramme de prédominance de différentes séquences réactionnelles en fonction du pH [131]

la complexité des mécanismes ainsi qu'à la difficulté d'isoler une forme semi-quinone. C'est sans doute ce qui explique pourquoi l'étude à ce jour la plus complète a été effectuée sur la benzoquinone non substituée [127–134].

- Les différents schémas présentés ne tiennent compte que des réactions de transfert d'électrons interfaciales et des protonations en solution. Or des réactions bimoléculaires, que l'on pourra appeler réactions croisées (entre deux quinones), sont envisageables en solution, que ce soit des réactions de transfert d'électrons, de protons, ou d'atome d'hydrogène. Elles peuvent faire intervenir des formes benzoquinones, hydroquinones ou semi-quinones.
- Le modèle de Laviron ne prend en compte que des mécanismes séquentiels de transfert d'électron. Or des mécanismes concertés pourraient éventuellement être envisageables, tels que décrits dans le groupe de Savéant [135].

La connaissance du comportement électrochimique des quinones en milieu aqueux s'inscrit dans le contexte général de cette thèse. En effet, il s'agit de régénérer par voie électrochimique l'espèce oxydée  $Q$  à partir de la forme réduite  $QH_2$  issue de la dérivation des électrons photosynthétiques. Ceci impose donc la connaissance du potentiel à appliquer à l'électrode de travail pour oxyder  $QH_2$  en  $Q$ .

Dans ce contexte, les différentes quinones envisagées dans le chapitre précédent seront étudiées par voltammétrie cyclique. Bien qu'une simple information (le potentiel à appliquer) nécessite d'être extraite de ces voltammétries dans le cadre du projet, les résultats

obtenus seront commentés à la lumière du modèle de Laviron.

## 3.2 Etude expérimentale de l'oxydation de composés de type hydroquinone

### 3.2.1 Etude sur une électrode de carbone nue

#### 3.2.1.1 Cas du couple benzo/hydroquinone

Le comportement de l'hydroquinone (à 5 mM) a été étudié en fonction du pH, il semble apparaître que, à cette concentration, les réactions croisées ne sont pas négligeables. Toutefois, il aurait été possible de diminuer l'influence des réactions croisées au regard du schéma carré en réduisant la concentration. En effet, les réactions croisées sont d'ordre 2 par rapport à la concentration en quinone, alors que les réactions du schéma carré sont d'ordre 1. Cela ne sera cependant pas davantage détaillé dans le corps du texte de ce document.

##### 3.2.1.1.1 Etude de l'hydroquinone

Un voltammogramme de l'hydroquinone est représenté en figure 3.13. Il apparaît que ce composé s'oxyde facilement dans des conditions expérimentales classiques. Par ailleurs le courant est limité par la diffusion, comme en témoigne un courant de pic proportionnel à la racine carrée de la vitesse de balayage (figure 3.14). Cela ne signifie pas pour autant qu'il n'y a pas d'adsorption de la quinone sur l'électrode, mais que, si tel est le cas, les cinétiques d'adsorption/désorption sont élevées par rapport à celle de la diffusion. En effet, la cinétique du transfert d'électron de ce composé étant connue pour dépendre de la surface de l'électrode, un mécanisme en sphère interne est attendu.

Comme mentionné précédemment, il s'agit d'étudier le comportement électrochimique des formes QH<sub>2</sub> issues de formes Q utilisées dans le chapitre 2 pour dériver les électrons photosynthétiques. Cependant en pratique, toutes les formes hydroquinones que l'on souhaite étudier ne sont pas disponibles commercialement. C'est pourquoi, afin de réaliser une étude homogène, des solutions de forme benzoquinone seront systématiquement uti-

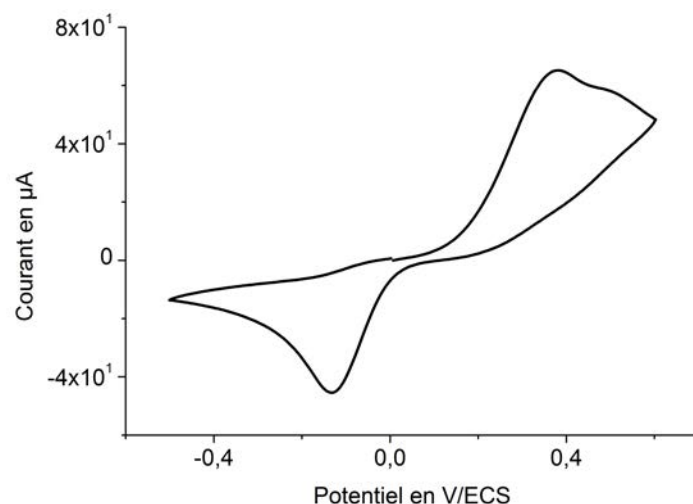


FIGURE 3.13: Voltammogramme de l'hydroquinone à 5 mM dans du PBS pH 7,4, électrode de carbone vitreux de rayon 3 mm, vitesse de balayage 50 mV/s.

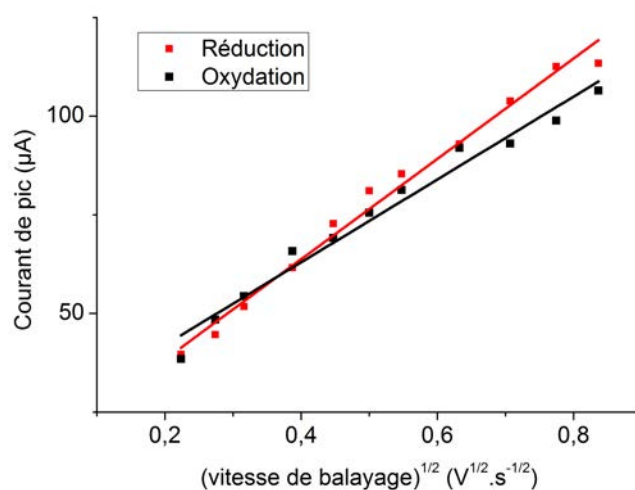


FIGURE 3.14: Courant de pic en fonction de la racine carrée de la vitesse de balayage, électrode de carbone vitreux de rayon 3 mm, hydroquinone 5 mM.

lisées. Le cas de la quinone sans substituant (dont les formes oxydées et réduites sont disponibles commercialement) a été utilisé à titre d'exemple pour observer l'influence de l'espèce dominante au cœur de la solution.

#### 3.2.1.1.2 Différence de comportement entre la benzoquinone et l'hydroquinone



Les voltammogrammes de l'hydroquinone et de la benzoquinone ont pu être comparés dans les mêmes conditions que précédemment (figure 3.15).

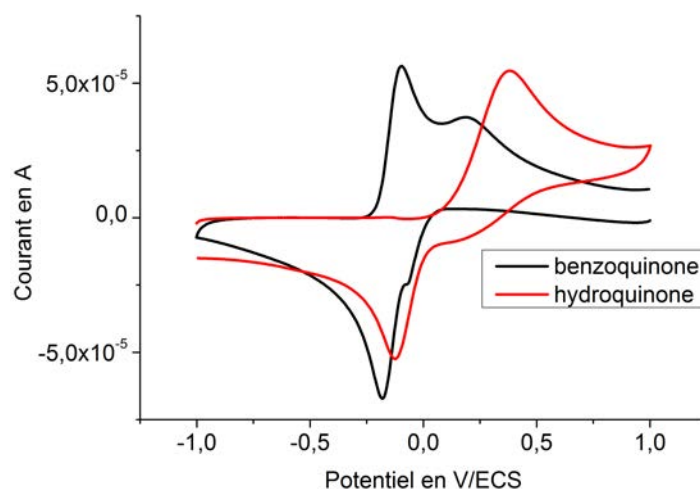


FIGURE 3.15: Voltammogrammes de l'hydroquinone et de la benzoquinone à une concentration de 5 mM, électrode de carbone vitreux de 3 mm vitesse de balayage de 50 mV/s, PBS pH 7,4.

Une différence notable de comportement apparaît lorsque les voltammogrammes sont enregistrés à partir d'une solution de benzoquinone, le premier balayage étant dans le sens cathodique, ou à partir d'une solution d'hydroquinone, le premier balayage étant dans le sens anodique. Cela ne peut pas s'expliquer sur la base des modèles de Laviron déjà présentés. En effet, les solutions étant tamponnées, le pH de la solution est fixé, le déplacement des équilibres acido-basiques doit donc être indépendant de la nature de l'espèce dominante en solution ainsi que du sens de balayage<sup>1</sup>. Les potentiels standards, et les différentes constantes de vitesse du mécanisme à l'œuvre (constante de vitesse de transfert d'électron, éventuelles constantes de vitesses d'adsorption/désorption) sont également, a priori indépendants du sens de balayage.

En revanche, il est à noter que les réactions successives de type ECEC, par exemple, telles que prises en compte par Laviron dans son schéma carré sont concurrentielles avec d'autres types de réaction, des réactions croisées telles que les DISP (réactions de deux semi quinones pour former une benzoquinone et une hydroquinone). Le schéma carré à 9

1. Une influence d'une variation de pH due à un pouvoir tampon insuffisant ne peut toutefois pas être totalement exclue sur la base de ces données

espèces est repris pour illustrer le propos en figure 3.16.

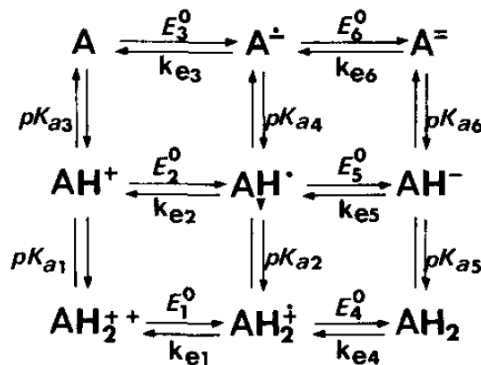


FIGURE 3.16: Schéma carré à 9 espèces dans le cas d'un échange de 2 électrons et de 2 protons [131].

Différentes réactions intermoléculaires peuvent être ainsi envisageables. On pourra citer des réactions se traduisant, au bilan, par un transfert de proton, un transfert d'électrons ou un transfert d'hydrogène dont voici des exemples respectifs. Ci dessous sont représentés des exemples mettant en jeu la forme semi-quinone.



Dès lors, la nature de l'espèce majoritaire présente en solution peut modifier le déplacement de ces équilibres chimiques, ce qui peut modifier le mécanisme réactionnel donc l'allure des voltammogrammes.

Il est à noter que l'existence de certaines réactions croisées a été montrée par Laviron [127]. L'hypothèse selon laquelle cette différence de comportement entre la benzoquinone et l'hydroquinone est explicable par ces réactions peut se vérifier relativement facilement expérimentalement. En effet, comme dit précédemment, ces réactions sont d'ordre 2 par rapport aux concentrations en réactifs, alors que les réactions du schéma carré sont d'ordre 1. Une baisse de la concentration de l'espèce électroactive devrait donc minimiser les processus mettant en jeu ces réactions, au profit des réactions types schéma carré. Aux faibles concentrations, les voltammogrammes des formes benzo et hydroquinones doivent donc être plus similaires, ce qui a pu être vérifié expérimentalement (figure 3.17).

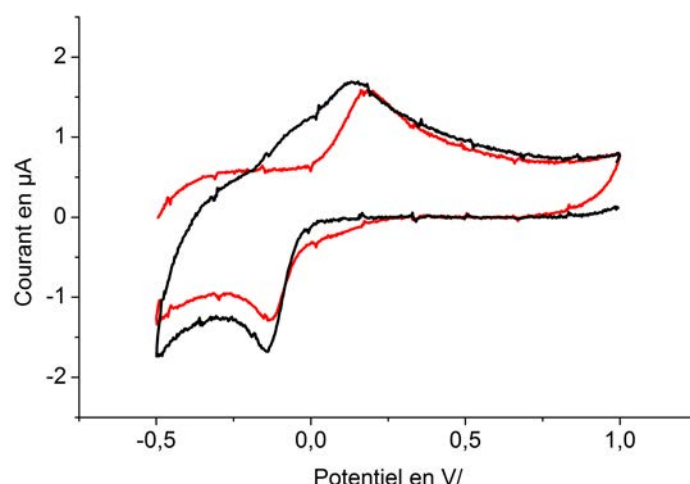


FIGURE 3.17: Voltammogrammes de l'hydroquinone (rouge) et de la benzoquinone (noir) à une concentration de 0,5 mM, électrode de carbone vitreux de 1 mm, PBS pH 7, vitesse de balayage de 50 mV/s.

Si les comportements ne sont pas strictement identiques, ils tendent toutefois à devenir similaires. Des épaulements subsistent, d'une manière différente selon la nature du composé. Il est possible qu'ils soient dus à un reste de réactions croisés. En effet, une baisse de la concentration d'un facteur 10 diminue leur importance relative par rapport au schéma carré d'un facteur 10 également. Il n'est donc pas surprenant que ces mécanismes subsistent sous forme d'épaulements.

Comme mentionné précédemment, les formes hydroquinones ne sont pas commercialement accessibles pour tous les médiateurs. Ceci impose de travailler sur des solutions de forme benzoquinone et donc de réaliser l'étude de leurs caractéristiques électrochimiques en utilisant le balayage retour. Par ailleurs cette méthode de travail présente l'avantage d'être également plus proche des conditions utilisées en bioélectrochimie, (dans lesquelles des solutions de benzoquinone seront utilisées).

### 3.2.1.2 Cas des autres médiateurs

Le comportement des autres médiateurs a également été étudié par voltammétrie cyclique. Au delà du constat précédent sur les concentrations, à cause de leur solubilité limitée, les dichlorobenzoquinones ont été étudiées à une concentration de 500  $\mu\text{M}$  (figure 3.18). Ceci explique le ratio relativement faible de courant faradique/capacitif.

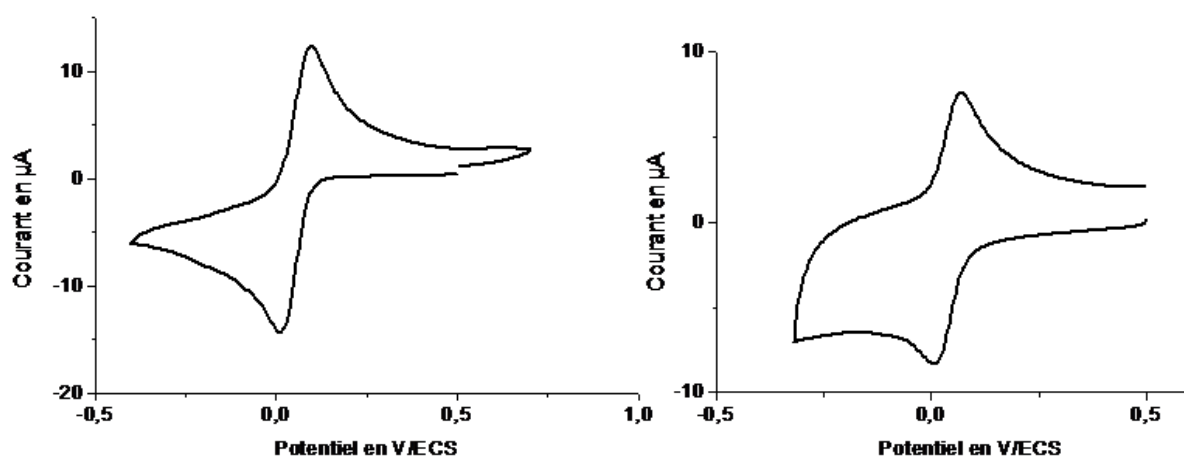


FIGURE 3.18: Voltammogrammes de la 2,6-DCBQ (à gauche) et de la 2,5-DCBQ (à droite) à une concentration de 0,5 mM dans le PBS, à une vitesse de balayage de 100 mV/s sur une électrode de carbone de 3 mm de rayon

Ces quinones présentent des comportements quasi-réversibles. Une observation plus précise des pics permet de distinguer des épaulements. Cela pourrait s'expliquer, à nouveau, par la présence de mécanismes concurrentiels, que ce soit d'autres chemins dans le schéma carré, ou encore des réactions croisées. Les DMBQ semblent être des systèmes

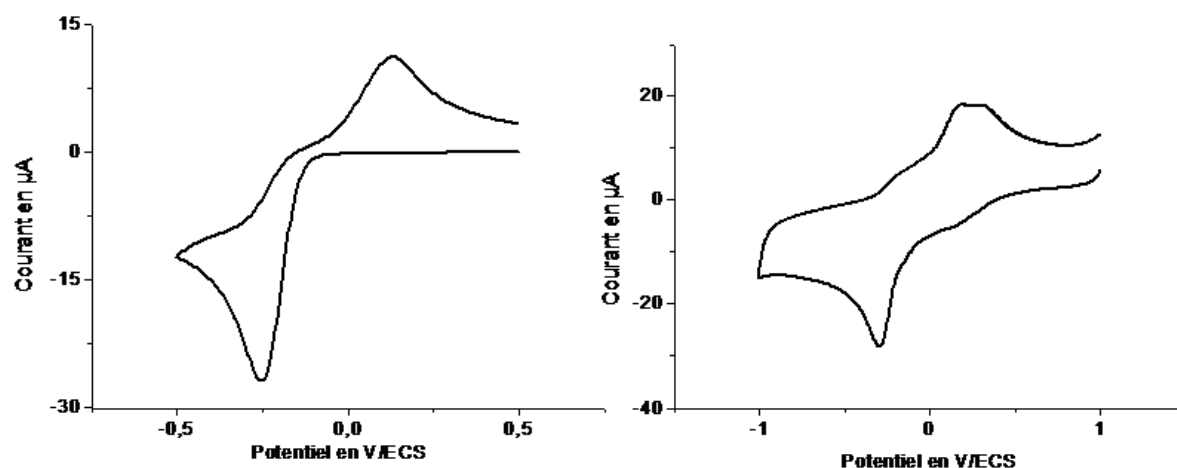


FIGURE 3.19: Voltammogrammes de la 2,6-DMBQ (à gauche) et de la 2,5-DMBQ (à droite) à une concentration de 1 mM dans le PBS, à une vitesse de balayage de 100 mV/s sur une électrode de carbone de 3 mm de rayon.

pour lesquels la réversibilité est moins marquée (figure 3.19). Le pic d'oxydation de la 2,5-DMBQ semble correspondre à deux pics, d'intensité similaire, trop proches pour être

résolus. Dans le cadre d'un schéma carré cela pourrait correspondre à des mécanismes dans lesquels les deux transferts d'électrons ne sont pas séparés par des transferts de protons. Cependant, d'autres possibilités sont envisageables, telles qu'un mécanisme de type ECEC dans lequel le deuxième transfert d'électron n'est pas plus facile que le premier. Enfin les quinones de type PPBQ et NBQ semblent donner des comportements peu réver-

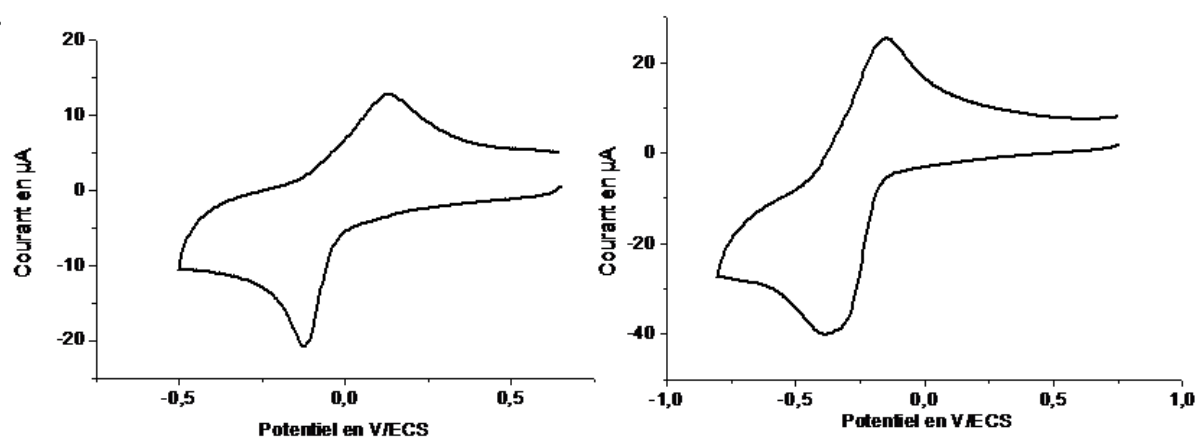


FIGURE 3.20: Voltammogrammes de la PPBQ (à gauche) et de la NBQ (à droite) à une concentration de 0,5 mM dans le PBS, à une vitesse de balayage de 100 mV/s sur une électrode de carbone de 3 mm de rayon

sibles (figure 3.20). Si des pics uniques de réduction et d'oxydation semblent être observés dans le cas de la phenyl-benzoquinone, ce n'est pas le cas de la naphthobenzoquinone, qui semble présenter deux pics de réduction d'intensité similaire, offrant les mêmes possibilités d'analyse que l'oxydation de la 2,5-DMBQ.

Si toutes les quinones semblent facilement oxydables dans des conditions classiques d'électrolyse biocompatible, l'irréversibilité plus ou moins forte des voltammogrammes de certaines quinones laisse entrevoir la possibilité de baisser le potentiel d'oxydation, en accélérant le système par exemple via une modification de la nature de la surface de l'électrode.

## 3.2.2 Influence d'un prétraitement surfacique de l'électrode

### 3.2.2.1 L'état de l'art

Il a été montré dans la littérature [136] qu'un prétraitement anodique de la surface d'électrode de carbone vitreux pouvait accélérer le transfert d'électron. Cela a été montré par voltammétrie cyclique (baisse de l'écart entre les pics d'oxydation et de réduction) les résultats étant représentés sur la figure 3.21.

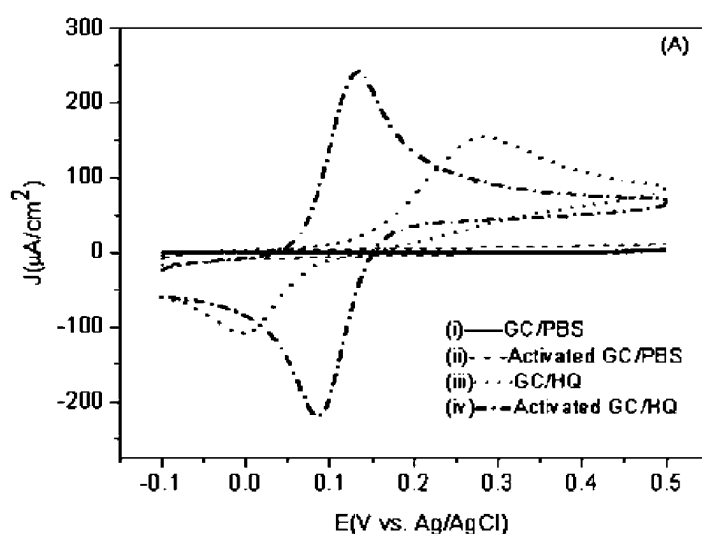


FIGURE 3.21: Voltammogramme de l'hydroquinone 0,5 mM en milieu PBS sur une électrode de carbone vitreux (3 mm de diamètre) nue (iii) et pré-traitée (iv), blanc (PBS) sur électrode nue (i) et pré-traitée (ii) [136]

Le prétraitement consiste à polariser l'électrode à un potentiel de 1,7 V/Ag/AgCl, pendant une durée de 400 s dans du PBS. Le fait que ce transfert d'électron puisse être accéléré par un traitement de surface est cohérent avec un mécanisme en sphère interne, dont les quinones sont réputées faire usage. Cet effet catalytique est attribué par les auteurs à la formations de groupements C=O et C—OH. Les oxygènes ainsi présents sur la surface peuvent former des liaisons hydrogènes avec les groupements OH des hydroquinones, ce qui affaiblit la liaison entre l'oxygène et l'hydrogène.

Toutefois, les auteurs ne commentent pas l'accélération de la réduction de la benzoquinone, également observée sur le même voltammogramme. Néanmoins, une explication similaire pourrait être avancée, impliquant uniquement les groupements hydroxy. En effet ceux ci pourraient engager une liaison hydrogène avec les groupements C=O des quinones,

facilitant le transfert de proton lié au transfert d'électron. Par ailleurs, cela pourrait se traduire également par un transfert d'atome d'hydrogène.

Dans le cas de l'oxydation comme dans celui de la réduction, la formation d'une liaison hydrogène peut également favoriser un positionnement de la quinone par rapport à un autre, ce qui est susceptible de modifier la cinétique de transfert d'électrons, via une modification du couplage électronique entre le centre électroactif et l'électrode.

En conclusion, le mécanisme par lequel le prétraitement anodique de l'électrode affecte la cinétique du processus global de transfert d'électrons demeure non déterminé avec fiabilité. En effet, même si l'hypothèse avancée par les auteurs reste pertinente, elle n'est prouvée par aucune donnée ni expérimentale ni théorique. Des indications quant à la réalité du mécanisme catalytique pourraient être obtenues en observant la variation de la cinétique de transfert d'électron lorsque les conditions de prétraitement sont modifiées. En effet, un changement du temps de traitement pourrait permettre de faire varier le taux de recouvrement de l'électrode par les groupements oxydés. De plus, une modification du potentiel pourrait permettre de modifier le ratio  $C=O/C-OH$ . Cela pourrait donner des éléments pour une discrimination entre effets électroniques et effets stériques.

Malgré ces limites mécanistiques, l'accélération du transfert d'électrons est clairement mise en évidence et sera étudiée par la suite dans cette étude dans le cas des quinones utilisées.

### **3.2.2.2 Résultats expérimentaux**

Nous avons pu vérifier expérimentalement les résultats présentés dans la publication précédente (figure 3.23), à savoir que le transfert d'électron de l'hydroquinone était accéléré si l'électrode avait subi un prétraitement oxydant. Pour cela, la polarisation a été effectuée dans une solution séparée de PBS (figure 3.22).

Quant au comportement des autres médiateurs électrochimiques, deux types de comportements ont été observés : le cas des quinones sans substituants chlorés et celui avec substituants chlorés.

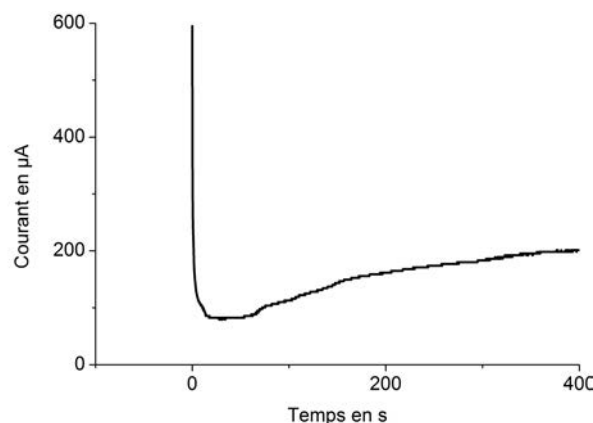


FIGURE 3.22: Courant en fonction du temps sur une électrode de 3 mm de rayon, potentiel de 1,7V/ECS pendant 400 s, procédure détaillée par Ahammad et al [136].

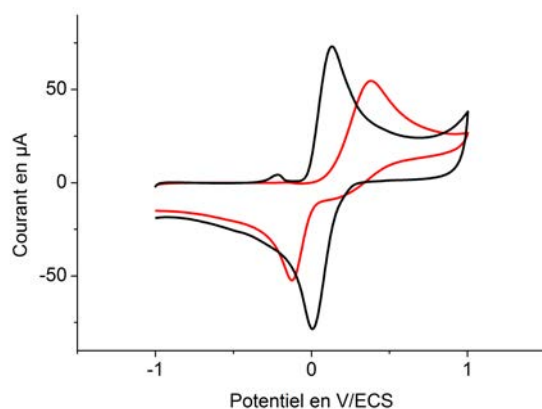


FIGURE 3.23: Voltammogrammes à 100 mV/s de l'hydroquinone (5 mM) sur une électrode de carbone vitreux de 3 mm de rayon nue (en rouge) et polarisée (en noire) selon la méthode décrite par Ahammad et al [136].

### 3.2.2.2.1 Cas des quinones sans substituants chlorés

Dans le cas de ces médiateurs (figure 3.24 et 3.25), une nette accélération du transfert de charge est observée. Une hausse du courant capacitif est également observée, les blancs ayant permis d'observer une réduction de la fenêtre d'électroactivité du milieu. Ceci est logique si l'on considère que l'accélération du transfert d'électron des quinones se fait via des liaisons hydrogène, car l'eau en est également donneur et accepteur.

Ceci permet, dès lors, de mieux comprendre l'allure du chronoampérogramme de polarisation. En effet, la polarisation de l'électrode augmente à la fois la capacité de l'électrode



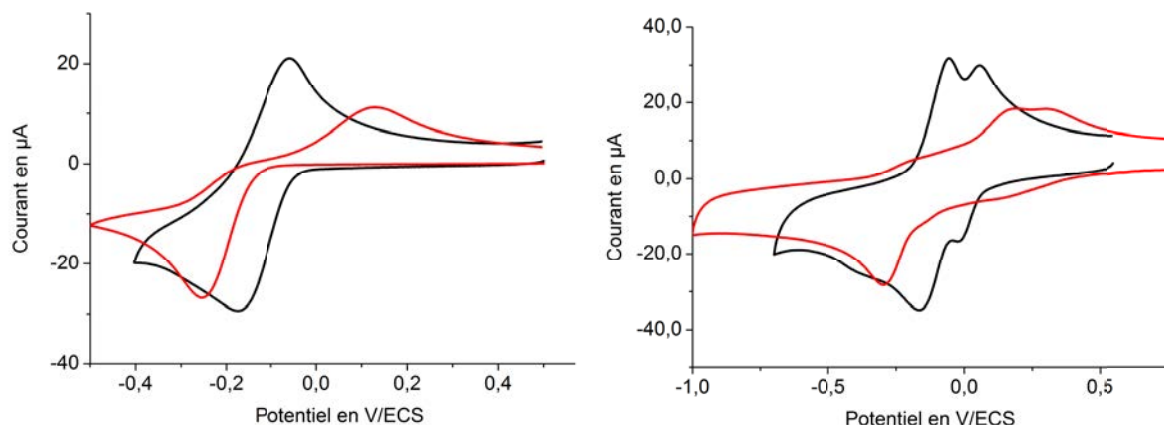


FIGURE 3.24: Voltammogrammes des DMBQ (2,6-DMBQ à gauche et 2,5-DMBQ à droite), à une concentration de 1 mM, vitesse de balayage de  $100\text{mV/s}$ , sur une électrode de carbone de 3 mm de rayon nue (en rouge), prétraitée (en noir) selon la procédure détaillée par Ahammad et al [136].

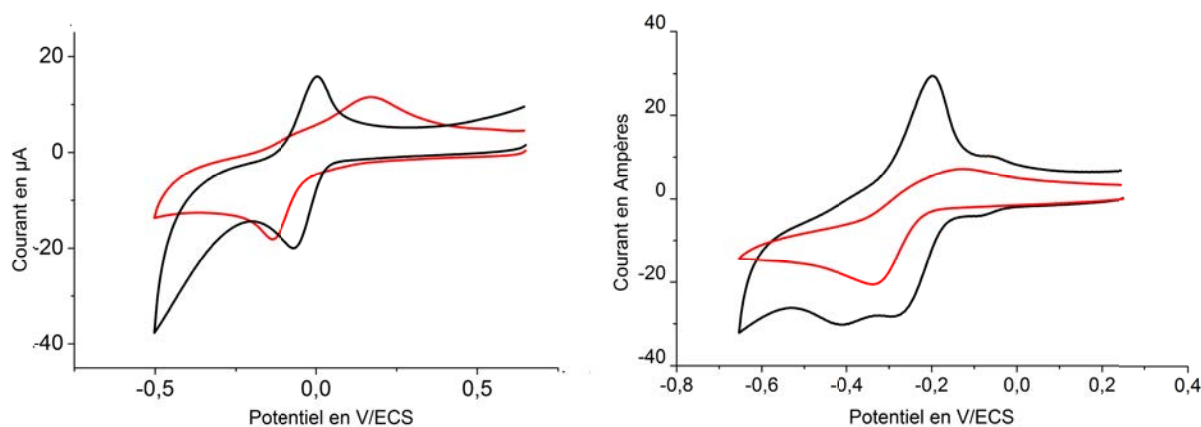


FIGURE 3.25: Voltammogrammes de la Phenyl-para-Benzoquinone (PPBQ, à gauche) et de la Naphtobenzoquinone (NBQ, à droite), à une concentration de 0,5 mM, vitesse de balayage de  $100\text{ mV/s}$ , sur une électrode de carbone de 3 mm de rayon nue en rouge, prétraitée en noir selon la procédure détaillée par Ahammad et al [136].

et la constante de vitesse d'oxydation de l'eau. Aux temps courts, le courant est donc décroissant car dominé par la décroissance exponentielle du courant capacitif, puis augmente à cause de l'augmentation de la capacité et du courant d'oxydation de l'eau, ce dernier étant vraisemblablement dominant.

### 3.2.2.2.2 Cas des dichloro-benzoquinones

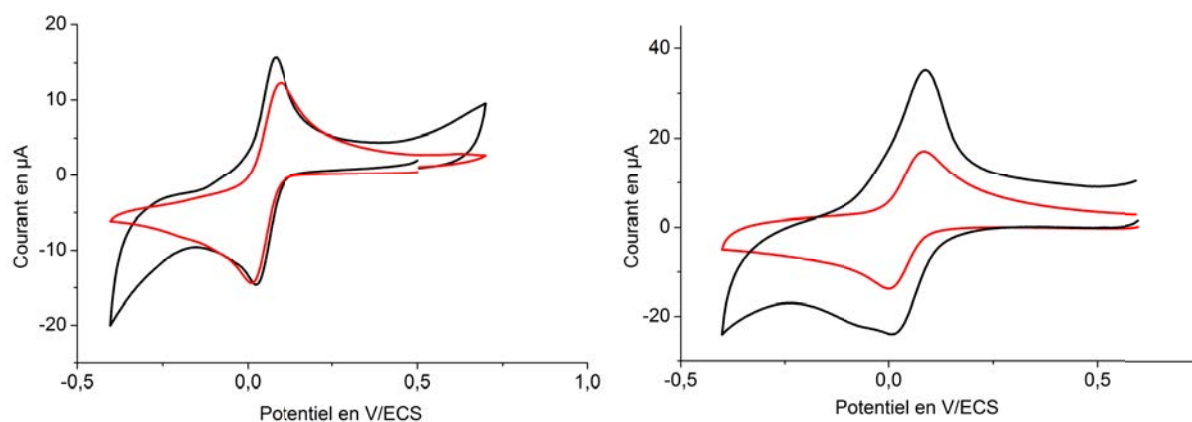


FIGURE 3.26: Voltammogrammes des DCBQ (2,6-DCBQ à gauche et 2,5-DCBQ à droite), à une concentration de 1 mM, vitesse de balayage de  $100\text{mV/s}$ , sur une électrode de carbone de 3 mm de rayon nue (en rouge), prétraitée (en noir) selon la procédure détaillée par Ahammad et al [136].

Dans le cas de ces quinones (figure 3.26), aucune modification du courant faradique n'est clairement observable suite à la polarisation. La plupart des quinones sont connues pour être des systèmes en sphère interne, néanmoins, au vu de la réversibilité du système sur électrode nue et de la similitude des courants faradiques après modification de la surface de l'électrode, il pourrait être possible que ce transfert ait lieu en sphère externe.

Afin de vérifier que ces différents comportements ne correspondent pas à une variation du nombre d'électrons échangés, nous avons mesuré ces derniers.

## 3.2.3 Mesure du nombre d'électrons

Une méthode pour calculer le nombre d'électrons impliqués dans un système rédox a été publiée par Amatore et al [137].

### 3.2.3.1 Présentation de la méthode

Le principe de cette méthode se base sur l'utilisation de la valeur du courant, qui est directement proportionnelle au nombre d'électrons échangés. La complication vient du fait que le courant dépend aussi du coefficient de diffusion et de la surface de l'électrode.

Le calcul d'un coefficient de diffusion s'effectue d'une manière simple, lorsque toutes les autres données sont connues, le nombre d'électrons échangés en premier lieu, ce qui n'est pas le cas du système étudié ici. Quant à la surface de l'électrode, si sa surface géométrique est aisément estimable, ce n'est pas le cas de sa surface active qui dépend du facteur de porosité de l'électrode, donc de la rugosité de la surface qui peut dépendre de plusieurs paramètres, le polissage en premier lieu.

L'idée de cette méthode est donc de chercher à éliminer ces paramètres indésirables en effectuant des mesures complémentaires. Ainsi, la surface d'électrode sera éliminée de l'équation en utilisant un étalon, une molécule dont le nombre d'électrons est connu. Le même type d'expérience (voltammétrie stationnaire ou transitoire, chronoampérométrie) sera réalisé avec ces deux molécules dans des conditions identiques. Cet étalon peut être utilisé comme un étalon interne ou un étalon externe, l'étalon interne présentant l'avantage de travailler dans des conditions de polissage identique, mais nécessite de ne pas avoir de recouvrement des figures de voltammétrie ni d'interaction entre l'analyte et l'étalon.

Le coefficient de diffusion sera éliminé en étudiant la même molécule mais avec une deuxième technique électrochimique, dans laquelle l'expression du courant fait intervenir le coefficient de diffusion à un autre exposant. Ainsi peuvent être utilisées les techniques transitoires (chronoampérométrie, voltammétrie sur électrode fixe) ou stationnaires (voltammétrie sur électrode à disque tournant ou sur UME).

Les différentes techniques sont caractérisées par des temps caractéristiques, notés  $T_C$  (tableau 3.1), qui correspondent grossièrement au temps nécessaire à une molécule pour traverser la couche de diffusion<sup>2</sup>. Le nombre d'électrons étant potentiellement dépendant de ce temps, il est nécessaire de travailler avec des temps caractéristiques de même ordre de grandeur.

Il apparaît qu'il est possible de combiner ces courants afin de simplifier le coefficient de diffusion. Ainsi, si le courant de chronoampérométrie et le courant limite de voltammétrie

---

2. Dans le cas des voltammétries stationnaires (sur électrode à disque tournant ou sur UME), l'emploi du temps caractéristique est donc double. En effet, en plus de vérifier que les données ont été calculées sur la même gamme de temps d'une méthode à l'autre, l'échantillonnage doit être suffisamment lent au regard du temps caractéristique pour être dans des conditions stationnaires, ce qui constitue un prérequis à l'emploi des formules données.

Méthode	Courant	$T_c$
Chronoampérométrie	$i_{chrono} = \frac{n_{TC} F A C D^{1/2}}{\sqrt{\pi t}}$	t
Voltammétrie hydrodynamique	$i_{l,dt} = 0,62 n_{TC} F A D^{2/3} C w^{1/2} \nu^{-1/6}$	$\frac{1,61 \nu^{1/3}}{w D^{1/3}}$
Voltammétrie sur UME disque	$i_{l,ume} = 4 n F D C r_0$	$\frac{1,61 \nu^{1/3}}{w D^{1/3}}$

TABLE 3.1: Tableau récapitulant les expressions des courants et courants limites obtenus respectivement en chronoampérométrie et en voltammétrie stationnaire (hydrodynamique ou sur UME disque) ainsi que l'expression des temps caractéristiques respectifs, avec  $n_{TC}$  le nombre d'électron échangé au temps  $T_C$ ,  $F$  la constante de Faraday,  $A$  l'aire de l'électrode,  $C$  la concentration en solution,  $D$  le coefficient de diffusion,  $t$  le temps,  $w$  la vitesse de rotation de l'électrode,  $\nu$  la viscosité cinématique de la solution,  $r_0$  le rayon de l'électrode.

stationnaire sont utilisés :

$$\frac{i_{chrono}^4}{i_{l,dt}^3} = \frac{(n_{TC} F A C)^4 (\pi t)^{-2}}{(0,62 w^{1/2} \nu^{-1/6})^3} \quad (3.14)$$

La même équation peut être appliquée à l'étalon, avec  $n_e$  le nombre d'électrons échangés par l'étalon et  $C_e$  sa concentration :

$$\frac{i_{et,chrono}^4}{i_{et,l,dt}^3} = \frac{(n_e F A C_{et})^4 (\pi t)^{-2}}{(0,62 w^{1/2} \nu^{-1/6})^3} \quad (3.15)$$

D'où l'on peut déduire l'expression du nombre d'électrons échangés :

$$n_{TC} = n_e \frac{C_{et}}{C} \frac{i_{chrono}^4 i_{et,l,dt}^3}{i_{l,dt}^3 i_{et,chrono}^4} \quad (3.16)$$

Cette même grandeur peut être calculée en utilisant la chronoampérométrie et le courant limite mesuré sur une UME :

$$n_{TC} = n_e \frac{C_{et}}{C} \frac{i_{chrono}^2 i_{et,l,dt}}{i_{l,ume} i_{et,chrono}^2} \quad (3.17)$$

Ou encore les voltammétries stationnaires sur électrode à disque tournant et sur UME :

$$n_{TC} = n_e \frac{C_{et}}{C} \frac{i_{l,dt}^3 i_{et,l,ume}^2}{i_{l,ume}^2 i_{et,l,dt}^3} \quad (3.18)$$

La combinaison de la chronoampérométrie et de la voltammétrie sur UME semble donner les résultats les plus précis. En effet, les exposants élevés dans les formules des autres méthodes tendent à augmenter l'incertitude sur le résultat. Cependant, l'utilisation d'une UME présente certains inconvénients. En effet, elle suppose d'utiliser une autre électrode,

que celle utilisée pour la mesure complémentaire. Si l'étude est menée sur carbone vitreux, cela pose problème car il n'existe pas d'UME en carbone vitreux. Il faut donc utiliser un autre type de carbone, tel : : que la fibre de carbone. La nature de la surface de l'électrode en est donc modifiée ce qui peut induire des doutes sur les résultats, dans le cas de systèmes dépendant de la nature de la surface de l'électrode (mécanismes en sphère interne).

### 3.2.3.2 Résultats expérimentaux

Expérimentalement, l'étalon que nous avons utilisé est le ferrocène, dans des solutions séparées. Les chronoampérométries sont présentées en figure 3.27. Les données ont été

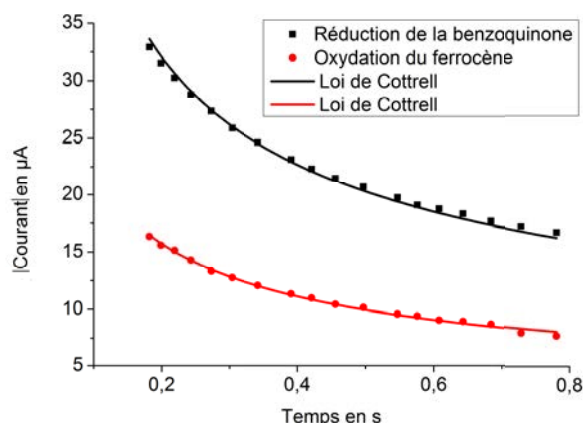


FIGURE 3.27: Courant mesuré à la fin d'une chronoampérométrie en fonction de la durée du saut potentiostatique, électrode de carbone vitreux 2 mm, concentration de 0,5 mM, modélisations par des lois de Cottrell (cas de la réduction de la benzoquinone,  $i=14,3.t^{-1/2}$ ,  $r^2 = 0,995$ , cas de l'oxydation du ferrocène  $i=7,03.t^{-1/2}$ ,  $r^2 = 0,996$ ).

modélisées par des équations de type Cottrell et les coefficients (voir la légende de la figure 3.27) seront utilisés pour le calcul du nombre d'électrons. De la même manière, une étude en fonction de la vitesse de rotation de l'électrode a été menée sur les mêmes solutions. Les données obtenues ont été simulées par des équations de type Lévisch (figure 3.28), le paramètre étant utilisé dans le calcul du nombre d'électrons.

Les autres quinones ont été étudiées de la même manière. Seule la naphthobenzoquinone n'a pu être étudiée ainsi car son pic de réduction étant proche du front de solvant et la solubilité étant faible, il était difficile d'avoir un rapport signal/bruit convenable, au vu

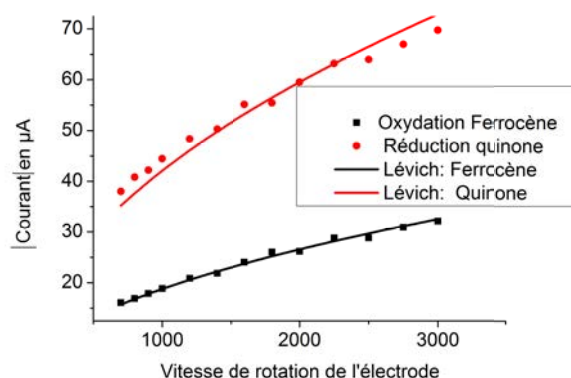


FIGURE 3.28: Courant limite de voltammogrammes enregistrés sur une électrode tournante en fonction de sa vitesse de rotation, modélisations par des équations de Lévich (cas de la réduction de la benzoquinone  $i=1,33\omega^{0,5}r^2 = 0,95$ , cas de l'oxydation du ferrocène  $i=0,59\omega^{0,5}r^2 = 0,992$ .

de l'incertitude induite par les exposants de la formule du nombre d'électron.

La conclusion de cette étude est que toutes les quinones étudiées, malgré les allures diverses de leur voltammogrammes, sont des systèmes biélectroniques (tableau 3.2) <sup>3</sup>.

Quinone	2,5-DCBQ	2,6-DCBQ	PPBQ	NBQ	2,5-DMBQ	2,6-DMBQ
n	$1,92 \pm 0,05$	$1,84 \pm 0,2$	$2,29 \pm 0,07$	$1,7 \pm 0,4$	$1,48 \pm 0,02$	$2,08 \pm 0,03$

TABLE 3.2: Résultats des mesures de nombre d'électrons impliqués pour les différentes quinones.

Le fait que les quinones étudiées correspondent à un comportement biélectronique en milieux aqueux ne constitue évidemment pas un résultat de grande originalité. Il permet toutefois de vérifier qu'à l'échelle de temps de la mesure, c'est l'espèce oxydée Q qui est régénérée et non une espèce intermédiaire de type semi-quinone.

### 3.3 Conclusion

En ce qui concerne les valeurs de potentiel impliquées dans ce système, le tableau 3.3 recense les potentiels de pics pour les différents médiateurs et les différents états de surface.

---

3. Sur certains médiateurs, en particulier la 2,5-DMBQ, une dépendance dans le temps du nombre d'électrons échangés semble être observée. Le nombre d'électrons ici donnés étant un nombre d'électrons moyen, il est cohérent d'observer une valeur intermédiaire entre 1 et 2.

Médiateur	BQ	2,5-DCBQ	2,6-DCBQ	PPBQ	NBQ	2,5-DMBQ	2,6-DMBQ
$E_{1/2}$ (mV)	-130	55	42	4	-330	8	-60
$E_{a,nue}$ (mV)	195	82	84	129	-160	315	137
$E_{a,pol}$ (mV)	95	95	85	65	-200	66	-61

TABLE 3.3: Tableau récapitulant les différentes valeurs de potentiel de demi-vague ( $E_{1/2}$ ), et de pic sur électrode nue ( $E_{a,nue}$ ) et polarisée ( $E_{a,pol}$ ) pour les différentes quinones.

On remarquera que l'on peut extraire des valeurs de "potentiel de demi-vague" (moyenne du potentiel du pic d'oxydation et de celui du pic de réduction), valeurs qui ont été utilisées précédemment dans le cadre du chapitre 2. En conclusion de cette étude, il a été observé que les quinones ont des comportements complexes en milieu aqueux, rendant délicate toute analyse mécanistique précise. Ce sont des systèmes relativement lents pour la plupart, mais pouvant être accélérés par d'éventuelles modifications de la surface de l'électrode, dont dépend la vitesse des mécanismes en sphère interne. Des différences de comportement marquées ont été observées pour certains médiateurs, bien que les systèmes en question sont également biélectroniques. Quoi qu'il en soit, les quinones exogènes utilisées dans ce travail s'oxydent à des valeurs de potentiels facilement accessibles dans des conditions d'électrolyse. L'électrochimie ne sera donc pas un point crucial quant au choix du futur médiateur.

Classiquement, le potentiel de travail utilisé en électrolyse est supérieur au potentiel de pic de 200 mV. Dans le cadre de ce projet, l'électrode de travail de l'électrolyse sera de nature différente de celle des voltamogrammes. C'est pourquoi, une plus grande marge de manoeuvre devra être prise, pour éviter toute limitation par la cinétique de transfert d'électrons.





# Chapitre 4

## Etude d'une régénération électrochimique des quinones photoréduites par la chaîne photosynthétique

Dans les chapitres précédents, les quinones les plus adaptées à la dérivation des électrons photosynthétiques sur algue ont été identifiées, de même que le potentiel à appliquer sur électrode de carbone pour régénérer des quinones photoréduites. Au delà de l'utilisation d'un montage expérimental pour atteindre cet objectif et obtenir des photocourants, il est souhaitable de poser le problème en amont en terme d'efficacité de la régénération électrochimique par rapport à celle de la réduction par la chaîne photosynthétique.

### 4.1 Prédictions théoriques

Dans cette partie, l'évolution temporelle du système biologique sera négligée. Il s'agit donc de prédictions permettant de décrire un cas dans lequel les phénomènes tels que la photoinhibition ou une éventuelle toxicité de la quinone sont négligeables .

En premier lieu, il est à noter que l'on part de solutions contenant uniquement la forme benzoquinone. La vitesse de la régénération électrochimique est donc initialement nulle quand celle de la réduction des quinones est maximale. Lorsque la proportion de formes

benzoquinones diminue, la vitesse de la régénération électrochimique augmente et celle de la dérivation électronique diminue. Il arrive alors un moment où ces vitesses seront égales, conduisant à l'obtention d'une proportion de sites ouverts constante au cours du temps. C'est cette proportion stationnaire que nous cherchons à analyser, dans un premier temps.

#### 4.1.1 Etude de la proportion de sites ouverts stationnaires aux temps longs

Une prise en compte de la régénération électrochimique peut être ajoutée à la variation de la concentration en benzoquinone au cours du temps due à la photoréduction par les algues (voir les paragraphes 2-3-1 et 2-3-2). Celle-ci peut alors s'écrire ainsi (équation 4.1) et vaut 0 aux temps suffisamment longs.

$$\frac{d[Q]}{dt} \underset{t \rightarrow \infty}{=} \frac{AD_{QH_2}[QH_2]}{\delta_c V} - \frac{v_{max}}{V} \frac{\rho_0[Q]}{1 + \frac{\rho_0}{D_\infty}[Q]} = 0 \quad (4.1)$$

Avec  $[Q]$  la concentration en forme benzoquinone,  $A$  la surface de l'électrode,  $D_{QH_2}$  le coefficient de diffusion de la forme hydroquinone,  $[QH_2]$  la concentration en forme hydroquinone,  $\delta_c$  l'épaisseur de la couche de diffusion,  $V$  le volume de solution,  $v_{max}$  la vitesse de réduction de la quinone lorsque tous les sites sont ouverts par le flux exogène,  $\rho_0$  la pente de la proportion de sites ouverts par le flux exogène en fonction de la concentration en quinone aux faibles concentrations et  $D_\infty$  la proportion de sites ouverts pour une concentration infinie en quinone.

Il convient dès lors de simplifier l'expression précédente en y introduisant des grandeurs adimensionnées représentant les valeurs des différentes constantes. L'égalité suivante peut alors être écrite.

$$k(1 - o) - \frac{o}{1 + bo} = 0 \quad (4.2)$$

Avec  $o$  défini comme étant égal à  $[Q]/C$ ,  $C$  étant la concentration totale en quinone,  $k$  une constante définie comme étant le rapport de la vitesse de la régénération électrochimique sur la vitesse de réduction de la quinone par les algues aux faibles concentrations en quinone ( $k = \frac{AD_{QH_2}}{\delta_c v_{max} \rho_0}$ ) et  $b = \frac{\rho_0 C}{D_\infty}$  un paramètre défini comme étant le ratio de la cinétique d'arrivée de la quinone à la poche  $Q_B$  et de la cinétique de transfert d'électrons.

La proportion de sites ouverts à l'état stationnaire peut donc s'exprimer après résolution de l'équation 4.2 :

$$o = \frac{k(1-b) + 1 - \sqrt{[k(1-b) + 1]^2 + 4k^2b}}{-2kb} \quad (4.3)$$

L'évolution de cette proportion peut être représentée en fonction des paramètres  $k$  et  $b$ . La figure 4.1 montre que différents domaines de limitations (nature de l'étape cinétiquement limitante) peuvent être représentés.

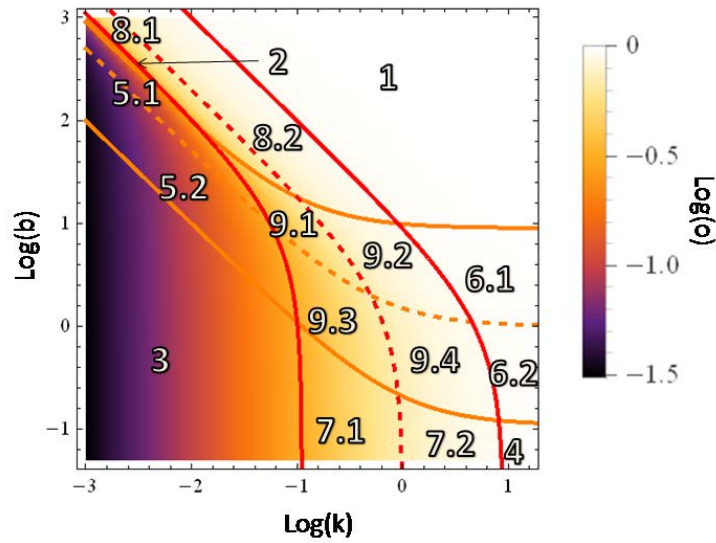


FIGURE 4.1: Evolution du  $\log(o)$  (couleurs) en fonction de  $\log(k)$  et de  $\log(b)$ , la ligne orange discontinue correspondant aux conditions dans lesquelles le flux électronique est limité à parts égales entre l'arrivée de la quinone à la poche  $Q_B$  et la vitesse de transfert d'électrons. Les lignes oranges continues délimitant les domaines dans lesquels sont cinétiquement limitants le transfert d'électrons (ligne du bas) et l'arrivée de la quinone (ligne du haut) à 10 % près. Les lignes rouges sont des lignes d'iso valeurs de  $(o)$  définissant le rapport entre la limitation du courant par la régénération électrochimique et par la dérivation électronique (limitation par la dérivation électronique à droite et par la régénération électrochimique à gauche). La zone notée 2 est indiquée par la flèche noire et nécessite que la ligne rouge la plus basse soit au dessus de la ligne orange la plus haute.

La ligne supérieure rouge correspond à la limite au delà de laquelle la proportion de quinones sous leur forme réduite est négligeable. La dérivation électronique y est donc l'étape cinétiquement limitante et la régénération électrochimique aura donc lieu à sa vitesse.

La ligne inférieure rouge correspond au cas limite inverse : la régénération électrochimique y est l'étape cinétiquement limitante et imposera sa vitesse à la dérivation électronique.

La ligne supérieure orange définit la valeur de  $b$  à partir de laquelle la dérivation électronique est contrôlée par la cinétique de transfert d'électrons. La ligne inférieure orange désignant de fait la limite en dessous de laquelle le courant est contrôlé par la cinétique à laquelle la quinone exogène accède au site  $Q_B$ .

Les mêmes zones que précédemment (figure 4.2) peuvent être superposées à un diagramme représentant l'évolution du courant. Le courant est donné, en valeurs dimensionnées, par l'équation suivante :

$$i = \frac{nFAD}{\delta_c} [QH_2] = nFCkv_{max}\rho_0(1-o) = nFkv_{max}bD_\infty(1-o) \quad (4.4)$$

Il est donc possible de normaliser le courant par celui obtenu en zone 1, à savoir dans le cas d'une dérivation électronique cinétiquement limitante et elle même limitée par la cinétique de transfert d'électrons, ce courant adimensionné étant alors noté  $\psi$  :

$$\psi = \frac{nFkv_{max}bD_\infty(1-o)}{nFv_{max}D_\infty} = kb(1-o) \quad (4.5)$$

La zone 1 correspond donc à un courant adimensionné tendant vers 1. Cela correspond donc à une dérivation électronique limitée par la vitesse de transfert d'électrons, avec une efficacité électrochimique quantitative.

$$\psi_1 = 1 \quad (4.6)$$

Dans les zones 2, 3 et 5, le courant est limité par la vitesse de la régénération électrochimique. Le fait que la dérivation électronique soit limitée par l'arrivée de la quinone ou par le transfert d'électrons n'influe donc pas sur le courant. Le courant adimensionné est donc donné par :

$$\psi_2 = \psi_3 = \psi_5 = kb \quad (4.7)$$

Dans la zone 4, le courant est contrôlé par la dérivation électronique, elle même contrôlée par la vitesse à laquelle la quinone accède au site. Le courant adimensionné est égal à  $b$ .

$$\psi_4 = b \quad (4.8)$$

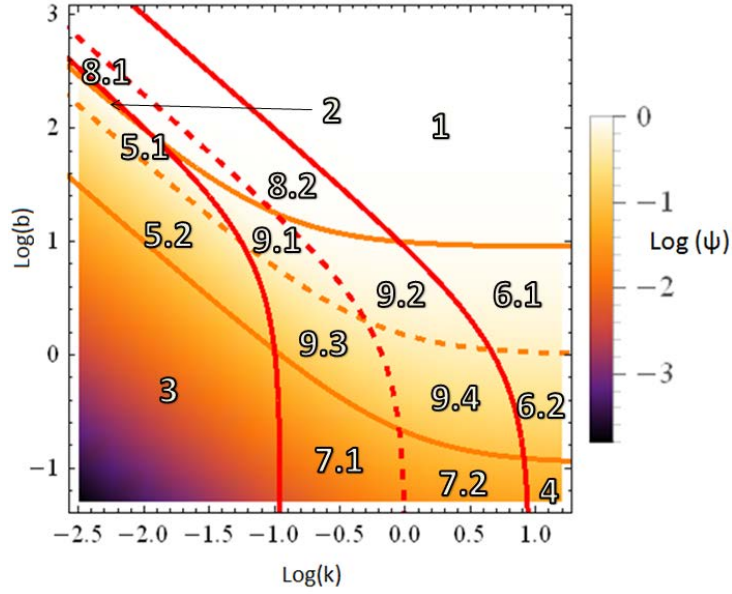


FIGURE 4.2: Evolution du  $\log(\psi)$  (couleurs) en fonction de  $\log(k)$  et de  $\log(b)$ . Les lignes ont la même signification qu'en figure 4.1.

Dans la zone 6, le courant est contrôlé par la dérivation électronique, sans qu'aucune étape n'y soit cinétiquement limitante. L'expression du courant adimensionné devient donc :

$$\psi_6 = \frac{b}{1+b} \quad (4.9)$$

Dans la zone 7, ni la dérivation électronique ni la régénération électrochimique ne sont cinétiquement limitantes. En revanche, la dérivation électronique est limitée par l'arrivée de la quinone au site. Le courant adimensionné devient :

$$\psi_7 = \frac{bk}{1+k} \quad (4.10)$$

Dans la zone 8, ni la dérivation électronique ni la régénération électrochimique ne sont cinétiquement limitantes. En revanche, la dérivation électronique est limitée par la cinétique de transfert d'électrons. Dès lors que le système est dans cette zone, la cinétique de dérivation électronique devient indépendante de la concentration en quinone. Or, le modèle considérant la valeur stationnaire du courant, la vitesse de la régénération électrochimique est égale à celle de la dérivation électronique, et est donc également fixée par la vitesse de transfert d'électrons entre la chaîne photosynthétique et la quinone exogène<sup>1</sup>.

1. Un comportement original est donc observé en zone 8.1. En effet, dans cette zone, la régénération

On retrouve donc l'équation de la zone 1.

$$\psi_8 = 1 \quad (4.11)$$

Ces résultats peuvent être résumés dans le tableau 4.1.

Zone	$\psi$	Contrôle courant	limitation
1	1	Dérivation	Transfert d'électrons
2	kb	Régénération	Transfert d'électrons
3	kb	Régénération	Arrivée de la quinone
4	b	Dérivation	Arrivée de la quinone
5	kb	Régénération	
6	$\frac{b}{1+b}$	Dérivation	
7	$\frac{bk}{1+k}$		Arrivée de la quinone
8	1		Transfert d'électrons

TABLE 4.1: Tableau récapitulatif de la nature des étapes limitantes en fonction de la zone de travail ainsi que des expressions des courants adimensionnés correspondants.

Ces premiers résultats donnent un canevas reliant la proportion de sites ouverts en fonction des différentes cinétiques impliquées dans la dérivation et la régénération à l'état stationnaire. Nous allons maintenant considérer la dynamique du système pour atteindre cet état stationnaire.

## 4.1.2 Etude de la dynamique à laquelle le courant stationnaire est atteint

### 4.1.2.1 Formalisme et mathématisation

Il s'agit de reprendre la même équation que précédemment concernant la variation de la concentration en benzoquinone au cours du temps 4.12, mais désormais non nulle.

$$\frac{d[Q]}{dt} = \frac{AD_{QH_2}[QH_2]}{\delta_c V} - \frac{v_{max}}{V} \frac{\rho_0[Q]}{1 + \frac{\rho_0}{D_\infty}[Q]} \quad (4.12)$$

électrochimique est moins efficace que la dérivation électronique (bien que non limitante), mais sa cinétique est contrôlée par la vitesse d'un phénomène lié à la dérivation. La cinétique du processus est donc ici contrôlée par l'étape la plus efficace, ce qui est original en cinétique chimique.

Il est possible d'y introduire les mêmes grandeurs adimensionnées que précédemment  $k$ ,  $o$  et  $b$  selon :

$$\frac{V}{v_{max}\rho_0} \frac{do}{dt}_{t \rightarrow \infty} = k(1 - o) - \frac{o}{1 + bo} \quad (4.13)$$

La résolution de cette équation amène à définir un temps noté  $\tau$  adimensionné par une constante de temps égale au temps nécessaire pour diminuer la concentration en benzoquinone d'un facteur  $e$  lorsque la régénération électrochimique est négligeable et que la dérivation électronique est contrôlée par l'arrivée de la quinone (zone 3).

$$\frac{do}{d\tau} = k(1 - o) - \frac{o}{1 + bo} \quad (4.14)$$

En séparant les variables :

$$\frac{1 + bo}{k(1 - o)(1 + bo) - o} do = d\tau \quad (4.15)$$

Les pôles de cette fonction rationnelle sont de multiplicité 1 et s'écrivent :

$$Z1 = -\frac{1 + k - bk + \sqrt{4bk^2 + (-1 - k + bk)^2}}{2bk} \quad (4.16)$$

$$Z2 = \frac{-1 - k + bk + \sqrt{4bk^2 + (-1 - k + bk)^2}}{2bk} \quad (4.17)$$

Par définition, l'égalité suivante peut donc être écrite :

$$\frac{1 + bo}{k(1 - o)(1 + bo) - o} do = \frac{1 + bo}{(-kb)(o - Z1)(o - Z2)} do \quad (4.18)$$

Or une telle fonction peut être décomposée en éléments simples :

$$\frac{1 + bo}{(-kb)(o - Z1)(o - Z2)} do = \frac{-1}{kb} \left( \frac{A}{o - Z1} + \frac{B}{o - Z2} \right) \quad (4.19)$$

Par identification, le système d'équation suivant est obtenu :

$$\begin{cases} A + B = b \\ -AZ2 - BZ1 = 1 \end{cases}$$

La résolution du système conduit donc aux expressions de  $A$  et  $B$  :

$$B = \frac{1 + Z2b}{Z2 - Z1} \quad (4.20)$$

$$A = \frac{-bZ1 - 1}{Z2 - Z1} \quad (4.21)$$

L'équation à résoudre est donc la suivante :

$$\int_1^o \left( \frac{A}{o - Z1} + \frac{B}{o - Z2} \right) do = -kb \int_0^1 d\tau \quad (4.22)$$

En intégrant :

$$A (\ln(o - Z1) - \ln(1 - Z1)) + B (\ln(o - Z2) - \ln(1 - Z2)) = -kb\tau \quad (4.23)$$

En isolant la variable :

$$A \ln(o - Z1) + B \ln(o - Z2) = A \ln(1 - Z1) + B \ln(1 - Z2) - kb\tau \quad (4.24)$$

D'après les propriétés de la fonction logarithme, il vient :

$$A \ln(o - Z1) + A \ln(o - Z2)^{B/A} = A \ln(1 - Z1) + B \ln(1 - Z2) - kb\tau \quad (4.25)$$

Puis :

$$\ln \frac{o - Z1}{(o - Z2)^{A/B}} = \ln(1 - Z1) + \ln(1 - Z2)^{B/A} - \frac{kb\tau}{A} \quad (4.26)$$

En appliquant la fonction exponentielle, l'équation finale est obtenue.

$$\frac{o - Z1}{(o - Z2)^{A/B}} = (1 - Z1)(1 - Z2)^{B/A} e^{\frac{-kb\tau}{A}} \quad (4.27)$$

Il n'est malheureusement pas possible d'isoler  $o$  dans cette expression, c'est pourquoi les graphiques seront tracés par des méthodes de simulation numérique.

#### 4.1.2.2 Résultats et discussion

Sur la base des grandeurs précédemment introduites, il est possible de modéliser l'évolution de la proportion de sites ouverts en fonction du temps. Ceci a été représenté en fonction du paramètre de concentration  $b$  sur des graphiques 3D pour 3 valeurs de  $k$  distinctes.

Lorsque  $k$  est grand (l'exemple de  $k=6$  est tracé Figure 4.3), la régénération électrochimique est plus efficace que la chaîne photosynthétique. La proportion de quinones sous forme oxydée restera donc proche de 1, l'électrochimie assurant ici un aspect préparatif efficace.

Cela se traduit logiquement par le fait que  $\psi$  tende vers 1 lorsque  $\tau$  et  $b$  sont suffisamment grands (figure 4.4). A l'état stationnaire, les zones 1, 4 et 6 précédemment décrites peuvent être atteintes selon la valeur de  $b$ .



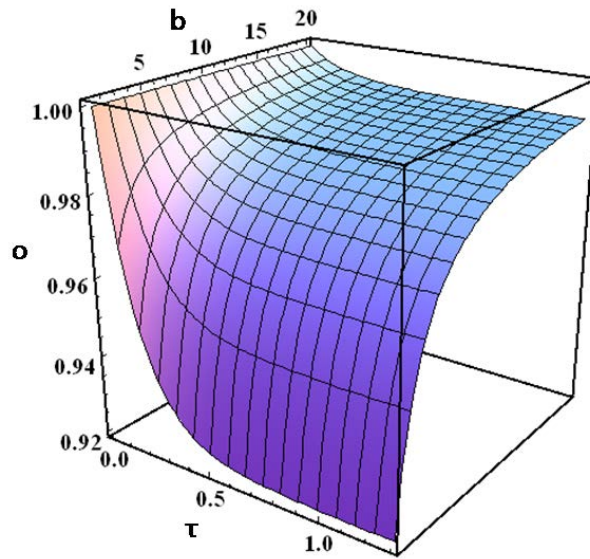


FIGURE 4.3: Evolution de la proportion de sites ouverts en fonction de  $\tau$  et de  $b$  pour une valeur de  $k$  égale à 6.

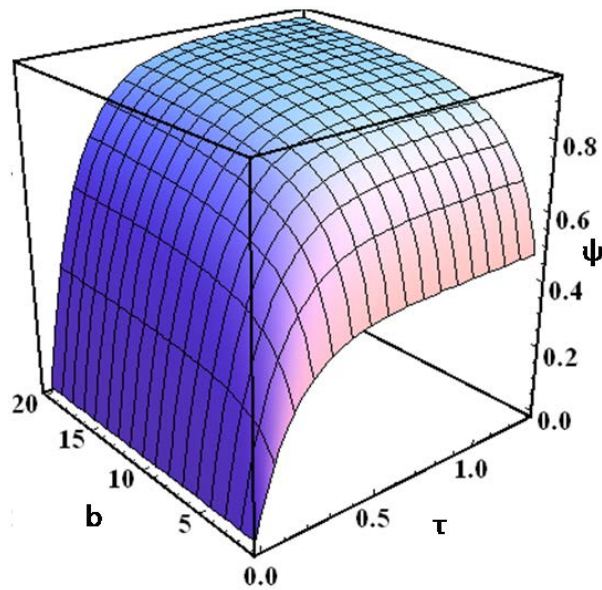


FIGURE 4.4: Evolution du courant adimensionné  $\psi$  en fonction de  $\tau$  et de  $b$  pour une valeur de  $k$  égale à 6.

Lorsque  $k$  est faible (l'exemple de  $k=0,04$  est tracé, Figure 4.5), la régénération électrochimique est moins efficace que la chaîne photosynthétique. Une réduction de la quinone presque totale s'effectue donc progressivement. Dans ce type de système, la régénération électrochimique a donc un objectif purement analytique, servant à observer la cinétique de réduction de la quinone par les algues.

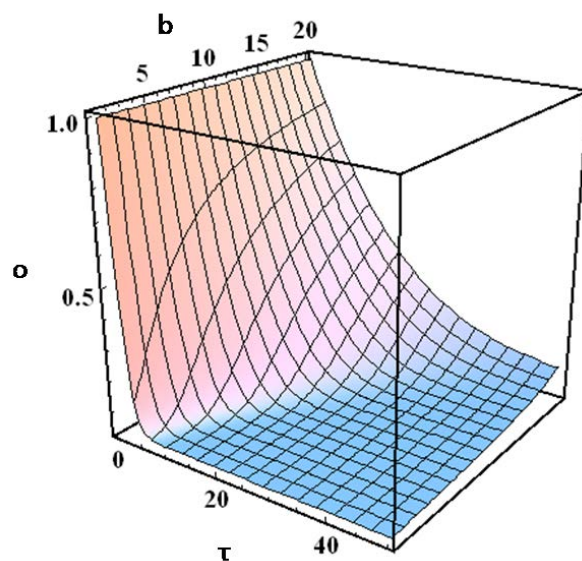


FIGURE 4.5: Evolution de la proportion de sites ouverts en fonction de  $\tau$  et de  $b$  pour un  $k$  de 0,04.

Ces conditions se traduisent logiquement par une valeur beaucoup plus faible du courant stationnaire (figure 4.6). Néanmoins, aux fortes valeurs de  $b$ , celui ci augmente artificiellement. En effet, la dérivation électronique est alors d'ordre 0 par rapport à la concentration en quinone alors que la dérivation électrochimique est d'ordre 1.

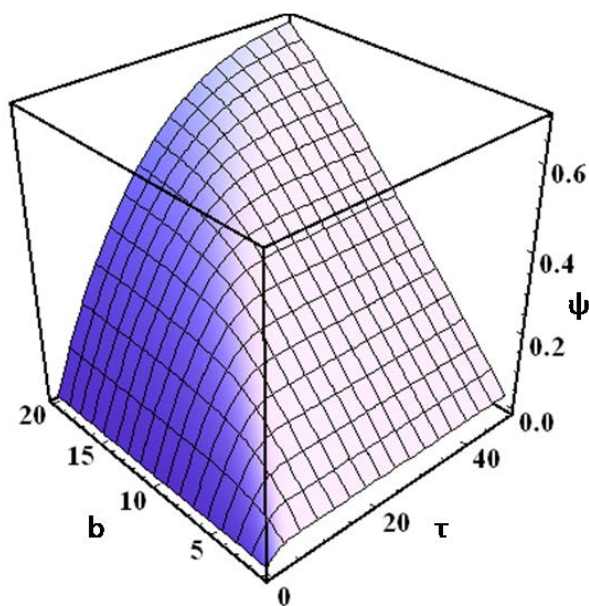


FIGURE 4.6: Evolution du courant adimensionné  $\psi$  en fonction de  $\tau$  et de  $b$  pour une valeur de  $k$  de 0,04.

Lorsque  $k$  est intermédiaire (l'exemple de  $k=0,4$  est tracé, figure 4.7), la régénération électrochimique et la dérivation des électrons ont des efficacités de même ordre de grandeur. Avec un tel système, le régime intermédiaire (zones 7, 8 et 9) est favorisé. Cependant, l'accès à la zone 1 est également possible moyennant une valeur de  $b$  suffisamment forte.

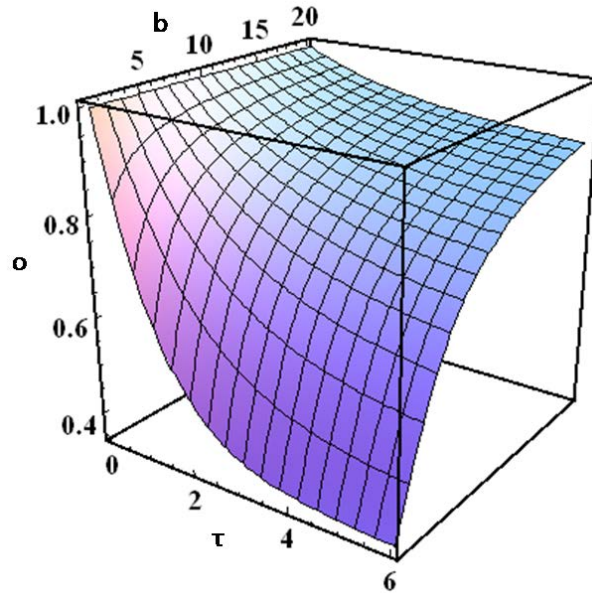


FIGURE 4.7: Evolution de la proportion de sites ouverts en fonction de  $\tau$  et de  $b$  pour une valeur de  $k$  de 0,4.

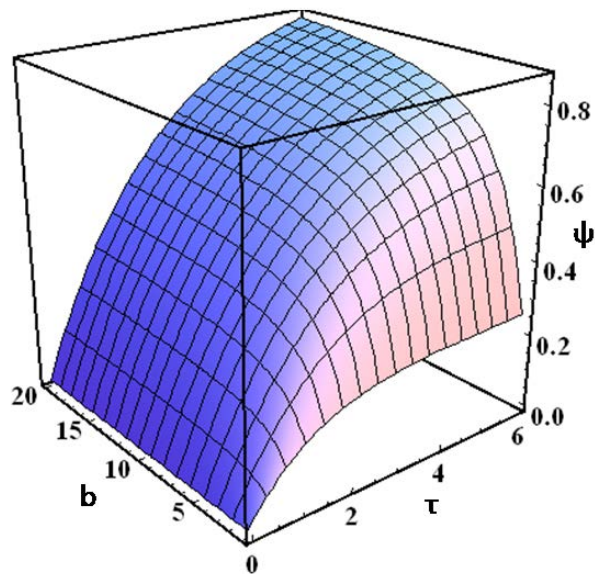


FIGURE 4.8: Evolution du courant adimensionné  $\psi$  en fonction de  $\tau$  et de  $b$  pour une valeur de  $k$  de 0,4.

Un tel système conduit logiquement à une variation forte du courant adimensionné en fonction des différents paramètres. Cela est présenté en figure 4.8.

Au terme de cette partie, nous avons exposé quelques tendances attendues en ce qui concerne l'établissement de la régénération en fonction des différentes cinétiques impliquées (dérivation électronique et régénération électrochimique). Nous allons maintenant mettre en regard ces prédictions et les résultats expérimentaux.

## 4.2 Résultats expérimentaux

### 4.2.1 Photocourants, cas de la 2,6-DCBQ

#### 4.2.1.1 Acquisition et traitement de données

Les photocourants ont été mesurés au cours du temps en chronoampérométrie en utilisant un dispositif constitué d'une cuve classique de spectroscopie (chemin optique 1 cm) soudée à une cellule électrochimique. Le volume total de solution utilisé est de 16 mL, et une électrode de travail en toile de carbone de haute surface spécifique est utilisée. Ce type d'essai étant a priori de longue durée, une double agitation de la cuve (magnétique dans le fond et mécanique au dessus) est utilisée (voir partie expérimentale). Cela permet de s'affranchir de la sédimentation des algues ainsi que d'homogénéiser la solution et de diminuer l'épaisseur de la couche stagnante<sup>2</sup>. Un exemple de photocourant obtenu est présenté en figure 4.9 avec la 2,6-DCBQ dont le choix résulte d'études présentées dans le chapitre 2. Il avait en effet été montré que cette quinone alliait de bonnes valeurs de  $\rho_0$  et de  $D_\infty$ .

Lorsqu'un potentiel est appliqué à l'électrode de travail en présence du milieu électrolytique contenant les algues, un fort courant capacitif apparaît et décroît avec une grande constante de temps dû à la grande surface spécifique de l'électrode (cf\* figure 4.9). Lorsque les quinones sont ajoutées un courant d'obscurité apparaît. La nature faradique du courant ne fait aucun doute car produit par le simple ajout de quinones. La nature non

---

2. Ceci permet à la fois d'améliorer l'efficacité de la collecte électrochimique en diminuant l'épaisseur limite de la couche de diffusion et renforce également la validité de l'hypothèse du régime stationnaire en diminuant de fait la durée du régime Cottrellien.

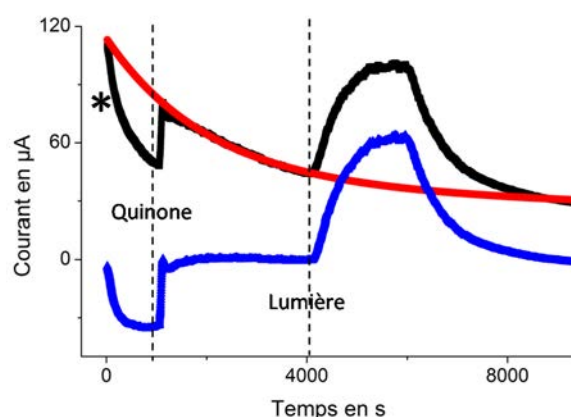


FIGURE 4.9: Courant en fonction du temps à un potentiel de travail de 650 mV/AgAgCl sur une suspension de mutants PetA ( $\Delta b_6f$ ) à une concentration de l'ordre de  $10^7$  cellules par mL au fil d'un cycle jour/nuit (flux lumineux incident de  $340 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ ) pour une concentration en 2,6-DCBQ de  $100 \mu\text{M}$ , en noir est représenté le courant mesuré, en rouge une modélisation de la ligne de base et en bleu le photocourant obtenu.

photosynthétique de ce courant est également prouvée par sa présence à l'obscurité. Une interprétation possible de l'origine de ce courant met en jeu les quinones présentes dans la chaîne respiratoire des mitochondries. Les quinones, capables de dériver les électrons de la chaîne photosynthétique, pourraient donc être également capables de capter les électrons de la chaîne respiratoire. Cela constitue donc une ligne de base, que l'on peut modéliser et soustraire pour obtenir le photocourant.

#### 4.2.1.2 Essais en fonction de la concentration et de l'intensité lumineuse sur un mutant sans $b_6f$ de *Chlamydomonas reinhardtii*

Une étude en fonction de la concentration en quinone et de l'intensité lumineuse a été menée. Ainsi on peut observer qu'une baisse de la concentration en quinone conduit à l'obtention d'un photocourant plus faible (figure 4.10).

La baisse de courant obtenue semble drastique compte tenu de la baisse de concentration appliquée. Néanmoins, de nombreux facteurs sont à prendre en compte, en premier lieu, les phénomènes de partition. Sur ce domaine de concentration, les membranes doivent être vraisemblablement saturées en quinones. Toute hausse de la concentration se traduit donc entièrement par une hausse de la concentration accessible à la photosynthèse alors

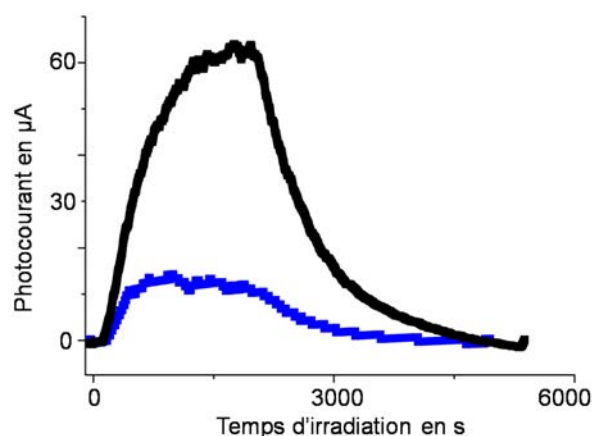


FIGURE 4.10: Courant en fonction du temps à un potentiel de travail de 650 mV/AgAgCl après soustraction de la ligne de base sur une suspension de mutants PetA ( $\Delta b_6f$ ) à une concentration de l'ordre de  $10^7$  cellules par mL au fil d'un cycle jour/nuit pour une concentration en 2,6-DCBQ de 40  $\mu\text{M}$  (en bleu) et de 100  $\mu\text{M}$  (en noir) à un flux de photons incident de  $340 \mu\text{E.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ .

qu'une fraction non négligeable de la concentration initiale est perdue dans les divers compartiments cellulaires.

L'activité mitochondriale est également susceptible d'avoir une influence. En effet, si elle est responsable du courant faradique observé à l'obscurité en présence de quinone, elle est susceptible de provoquer une baisse de la concentration en benzoquinone accessible à la photosynthèse, le ratio de la quinone accessible aux deux phénomènes étant alors susceptible de dépendre de la concentration en benzoquinone.

De plus, des phénomènes d'empoisonnement et de photoinhibition peuvent avoir lieu sur cette gamme de temps. L'efficacité de ces phénomènes est également susceptible d'être altérée par une modification de la concentration en forme benzoquinone, ce qui est susceptible de modifier la valeur du courant observé.

Il a également été essayé de faire varier l'intensité lumineuse. Ainsi un photocourant observé à une intensité de  $135 \mu\text{E.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  est représenté en figure 4.11. A cette intensité lumineuse, différentes concentrations ont été étudiées.

Il est visible que le photocourant est bien plus faible dans ces conditions (d'intensité et de concentrations) qu'à  $340 \mu\text{E.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  (figure 4.10). Cela exclut de fait les zones 2, 3 et 5 pour ce système à cette concentration. De plus, le ratio des courants (environ 3) semble peu différent du ratio des flux de photons lumineux incidents (2,5). De plus le courant

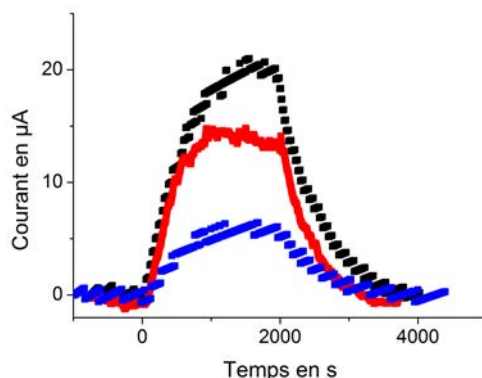


FIGURE 4.11: Courant en fonction du temps à un potentiel de travail de 650 mV/AgAgCl sur une suspension de mutants PetA ( $\Delta b_6f$ ) à une concentration de l'ordre de  $10^7$  cellules par mL au fil d'un cycle jour/nuit après soustraction de la ligne de base obtenu à un flux de photons incident plus faible ( $135 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ ) pour une concentration en 2,6-DCBQ de 100  $\mu\text{M}$  (noir), 75  $\mu\text{M}$  (rouge) et 40  $\mu\text{M}$  (bleu).

(de l'ordre de quelques dizaines de  $\mu\text{A}$ ) semble faible pour une électrode de très grande surface spécifique. En effet, la constante de temps observée lors de la décroissance du courant (de l'ordre de 440 s pour un volume de 16 mL) laisse imaginer un courant bien plus important que ceux obtenus, de l'ordre de plusieurs centaines de  $\mu\text{A}$ , si toutes les quinones étaient sous forme réduite. Cela laisse supposer que dans ces conditions expérimentales, la proportion de quinones sous forme oxydée demeure forte, et donc la régénération électrochimique n'est pas cinétiquement limitante. Ces conditions expérimentales permettent donc probablement de sonder quasi-exclusivement les zones 1, 4 et 6.

La valeur des photocourants stationnaires dépend clairement de la concentration. Cela peut s'expliquer facilement dans le cas des zones 4 et 6, dans le cadre de l'influence de la concentration en quinone sur la vitesse d'accessibilité au site  $Q_B$ . En effet, dans les zones 1, 4 et 6, la variation du courant en fonction de la concentration doit suivre une équation de type Michaélis-Menten (proportionnel à la concentration en zone 4, constant en zone 1 et un comportement mixte en zone 6).

En conclusion, l'évolution des courants stationnaires observés dans cette partie peut s'interpréter qualitativement à l'aide du diagramme de zones. Cependant, le mécanisme de photoinhibition, même s'il est globalement connu, rend difficile l'extraction d'une loi de vitesse qui implique suffisamment peu de paramètres pour permettre une corrélation

fiable à l'expérience. En effet l'étape cinétiquement déterminante du mécanisme de photoinhibition n'est pas connue. La réparation pose un problème du même ordre. A cela s'ajoute la variabilité expérimentale inhérente à une mesure réalisée en présence d'une convection externe et dépendante d'un matériel biologique. C'est pourquoi il n'a pas été réalisé d'étude quantitative de l'évolution du courant stationnaire en fonction des différents paramètres. Pour ces mêmes raisons, aucune simulation de l'évolution du courant en fonction du temps ne sera réalisée ici.

#### 4.2.1.3 Expériences sur une lignée sauvage

Le même type d'expérience d'extraction de photocourants a été menée sur une version sauvage de l'algue *Chlamydomonas reinhardtii* (figure 4.12).

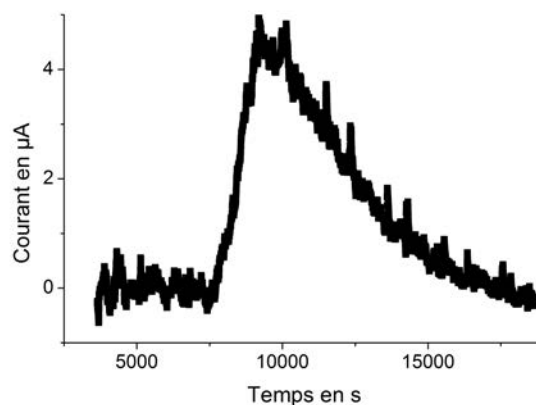


FIGURE 4.12: Courant en fonction du temps à un potentiel de travail de 650 mV/AgAgCl après soustraction de la ligne de base sur une suspension de *Chlamydomonas reinhardtii* sauvages à une concentration de l'ordre de  $10^7$  cellules par mL au fil d'un cycle jour/nuit pour une concentration en 2,6-DCBQ de 75  $\mu$ M à un flux de photons incident de 340  $\mu$ E.m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup>.

Les photocourants sont bien plus faibles que ceux observés sur un mutant sans  $b_6f$ . Cela est logique car, dans l'algue sauvage, la dérivation électronique est en compétition avec le flux endogène qui est presque nul dans le cas du mutant. Il est toutefois délicat de comparer les courants obtenus d'une manière réellement quantitative entre les deux types de chaînes. En effet, une modification de cette ampleur (suppression du  $b_6f$  qui annihile grandement le flux endogène) peut altérer d'autres caractéristiques de l'algue via une modification de sa résistance à la photoinhibition ou encore la baisse de la réduction



du  $\text{CO}_2$  <sup>3</sup>.

#### 4.2.1.4 Conclusion

Nous avons donc pu faire varier les conditions expérimentales pour enregistrer ces courants. Les valeurs stationnaires évaluées de ces photocourants obtenus sur le mutant sans  $b_6f$  sont présentées dans le tableau 4.2. Aucun résultat n'est présenté à 75  $\mu\text{M}$

$I^\circ \backslash C$	100 $\mu\text{M}$	75 $\mu\text{M}$	40 $\mu\text{M}$
340 $\mu\text{E.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$	$60 \pm 6$		$12 \pm 1$
135 $\mu\text{E.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$	$20 \pm 2$	$14 \pm 2$	$5 \pm 1$

TABLE 4.2: Tableau récapitulatif des différents courants stationnaires (en  $\mu\text{A}$ ) obtenus en fonction de la concentration en 2,6-DCBQ et du flux lumineux incident, sur un mutant  $\Delta b_6f$  de l'algue *Chlamydomonas reinhardtii*.

pour une intensité de 340  $\mu\text{E.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  car l'expérience à donné des résultats aberrants, l'expérience n'ayant pas pu être refaite . Sachant que la surface géométrique de l'électrode collectrice est de l'ordre de 1  $\text{cm}^2$ , les densités de photocourants obtenus sont, selon les conditions, de l'ordre de la dizaine de  $\mu\text{A.cm}^{-2}$ . Il est particulièrement délicat de comparer avec rigueur nos valeurs à celles d'autres systèmes recensés dans la littérature tant ceux-ci diffèrent en terme de dimensions d'électrode, d'illumination (puissance et durée), de concentrations en médiateur, en algues (le cas échéant) et surtout de nature intrinsèque du système étudié (adsorbé ou en suspension, utilisation de cellules entières ou d'organites extraits...).

Toutefois, nos valeurs sont globalement comparables avec les autres systèmes, qui pour la plupart ne considèrent pas des algues dans leur globalité.

---

3. Ceci est une illustration du fait que le phénotype est le résultat de l'expression du génotype dans un environnement donné. Si le terme d'environnement renvoie aux conditions extérieures, il apparaît ici qu'il est directement relié au génotype. Par exemple, si un mutant sans  $b_6f$  et un sauvage sont tous les deux irradiés à une même intensité lumineuse, le mutant aura davantage tendance à développer de la photoinhibition. On peut donc dire qu'il sera dans un environnement plus photoinhibiteur (ce qui est susceptible de provoquer une modification de la population cellulaire obtenue), alors que l'intensité lumineuse est identique.

Cependant, la valeur des photocourants stationnaires obtenue n'est pas suffisante en soi et il est nécessaire d'étudier l'évolution du système dans le temps.

### 4.2.2 Evolution dans le temps des photocourants observés

Au cours des expériences d'électrochimie présentées dans ce chapitre, les algues sont incubées en présence de quinone sur une longue durée (plusieurs heures). Il devient donc nécessaire d'étudier l'influence de cette incubation, ce qui a été quantifié par fluorescence. Les algues ont été maintenues sous agitation en présence de quinone (PPBQ, 2,6-DCBQ, 2,5-DCBQ, 2,6-DMBQ) et en absence de quinone comme témoin. Des cinétiques d'induction de fluorescence ont été enregistrées régulièrement en fonction du temps d'exposition, selon la même procédure que celle présentée au chapitre 2. Tout phénomène de photoinhibition a été évité en renouvelant de l'échantillon analysé à chaque fois. Un exemple est donné en figure 4.13, pour lequel on constate une baisse de la fluorescence au cours du temps.

Dans ces conditions, toute évolution du comportement de l'algue non présente chez le témoin en absence de quinones pourra être attribuée à un effet d'empoisonnement, c'est à dire à une toxicité de la quinone sur l'algue.

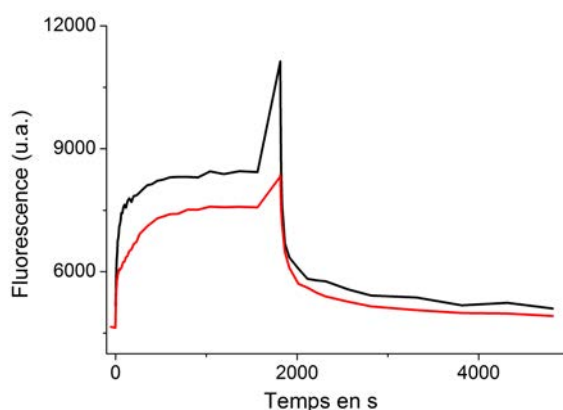


FIGURE 4.13: Fluorescence mesurée de la même manière qu'au chapitre 2 en présence de 25  $\mu\text{M}$  de 2,6-DCBQ, à  $t=0$  (en noir) et après 3 H d'incubation, courbe rouge

#### 4.2.2.1 Discussion sur la possibilité de l'apparition d'un quenching cinétique

Ce paragraphe est consacré à la présentation d'une hypothèse : la génération de quenchers de fluorescence. Son étude est assez simple car l'étude du quenching requiert un suivi de la fluorescence au niveau du pulse. Or le pulse de lumière sursaturante permet la fermeture de tous les centres réactionnels. Tout effet sur la cinétique de séparation de charges, directement via une altération de la protéine D, ou indirectement via une modification de l'état rédox du pool de plastoquinones n'altérera donc pas l'allure de ces résultats.

Expérimentalement la baisse de la fluorescence au niveau du pulse est bien observée, ce qui peut correspondre :

- à un phénomène de quenching cinétique
- à une destruction de l'entité fluorescente
- à une augmentation dans le temps de l'efficacité de la dissipation thermique

La dernière possibilité ne sera pas étudiée, car elle semble peu crédible. Expérimentalement, il ne semble pas apparaître une extinction complète du niveau de fluorescence  $F_{max}$ . Dans le cadre de la deuxième hypothèse, cela indiquerait que la destruction serait réversible, conduisant donc à un état d'équilibre, ce qui semble surprenant.

Nous allons donc montrer que cette baisse de fluorescence peut être explicable par l'apparition d'un "quenching cinétique" au cours du temps. En d'autres termes, l'empoisonnement se traduirait, à minima, par l'apparition de quenchers de fluorescence au cours du temps.

Il convient de rappeler que les quinones sont également des quenchers de fluorescence. Deux phénomènes de quenching seront donc ici à l'oeuvre simultanément. Il convient donc d'abord de vérifier que ces deux phénomènes sont bien aisément déconvoluables, condition nécessaire pour pouvoir les étudier indépendamment.

#### 4.2.3 Quenching cinétique et quenching spontané, des phénomènes déconvoluables ?

Considérons le schéma réactionnel décrit en figure 4.14 :

En considérant que l'état excité est un état instable, on peut lui appliquer l'AEQS

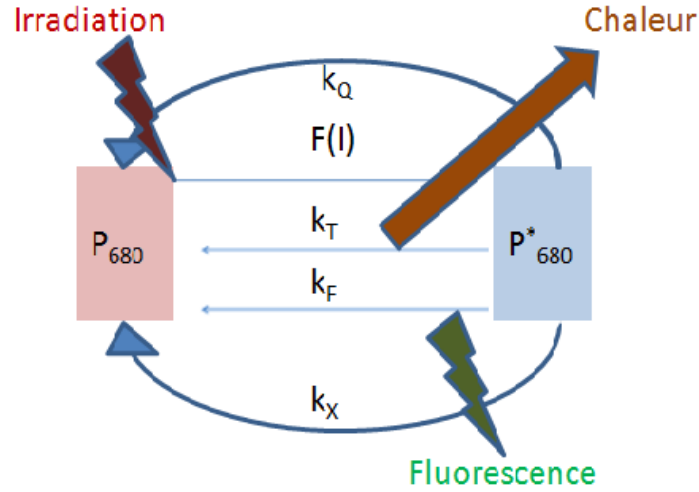


FIGURE 4.14: Schéma réactionnel des phénomènes d'excitation/déexcitation se produisant au niveau de la protéine  $P_{680}$  avec les constantes de vitesse et les flux correspondants,  $k_Q$  correspondant à la constante de vitesse du quenching par la quinone et  $k_X$  celle du quenching due à l'espèce X apparaissant au cours du temps en présence de quinone,  $F(I)$  la constante de vitesse d'excitation du  $P_{680}$  sous l'effet d'une irradiation d'une intensité égale à  $I$ .

(approximation de l'état quasi-stationnaire). Dès lors l'expression de la proportion de  $P_{680}$  sous sa forme excitée notée  $P_{680}^*$  :

$$P_{680}^* = \frac{(1 - P_{680}^*)f(I)}{k_T + k_F + [Q]k_Q + [X]k_X} \quad (4.28)$$

L'intensité de fluorescence est proportionnelle à  $P_{680}^*$ . La fluorescence au niveau du pulse est donc donnée par le produit de cette proportion par la constante de vitesse  $k_f$ .

$$F_{max} = \frac{k_F f(I)}{f(I) + k_T + k_F + [Q]k_Q + [X]k_X} \quad (4.29)$$

En absence de quinones, et donc d'empoisonnement, l'expression précédente se simplifie ainsi :

$$F_{max}^0 = \frac{k_F f(I)}{f(I) + k_T + k_F} \quad (4.30)$$

Dès lors on peut calculer le rapport des fluorescences :

$$\frac{F_{max}^0}{F_{max}} = 1 + \frac{Qk_Q}{f(I) + k_T + k_F} + \frac{Xk_X}{f(I) + k_T + k_F} \quad (4.31)$$

D'où on peut exprimer que le quenching est constitué de la somme des deux contributions, cinétiques (dû à l'espèces X qui apparait au cours du temps en présence de quinones)

et spontanées (dû directement aux quinones), indépendantes l'une de l'autre :

$$\frac{F_{max}^0 - F_{max}}{F_{max}} = QK_Q + XK_X \quad (4.32)$$

Avec  $K_Q$  et  $K_X$  les constantes de quenching, ou constantes de Stern-Volmer, respectivement spontanées et cinétiques et dont les expressions figurent ci dessous <sup>4</sup> :

$$K_Q = \frac{k_Q}{f(I) + k_T + k_F} \quad (4.33)$$

$$K_X = \frac{k_X}{f(I) + k_T + k_F} \quad (4.34)$$

#### 4.2.3.1 Etude du quenching cinétique

La déconvolution précédemment observée des deux types de quenching permet de les traiter indépendamment l'un de l'autre. Ainsi on peut définir un quenching cinétique, noté  $Q_c$  dans l'équation 4.35 comme étant la différence entre le quenching observé et sa valeur initiale en présence de quinones ( $QK_Q$ ).

$$Q_c = \frac{F_{max}^0 - F_{max}}{F_{max}} - \frac{F_{max}^0 - F_{max}}{F_{max}}_0 = XK_X \quad (4.35)$$

X est une espèce générée par l'empoisonnement, qui doit être issue de la dénaturation d'une entité biologique. Soit P l'entité biologique déstructurée avec une constante de vitesse notée k. Par souci de simplification P et X désigneront la proportion de l'entité biologique respectivement intacte et dénaturée sous forme d'un quancheur de fluorescence. On peut donc écrire :

$$P = e^{-kt} \quad (4.36)$$

Par conservation de la matière, et en supposant l'isostoechiométrie de la réaction entre réactif et produit, il vient :

$$X = 1 - e^{-kt} \quad (4.37)$$

---

4. Il apparait que ces constantes sont dépendantes de l'intensité lumineuse. On travaille ici à sites complètement fermés, l'intensité lumineuse qui apparait est donc l'intensité de détection. Cette intensité étant très faible, il est possible que f(I) soit très faible devant  $k_T$  et  $k_F$ , rendant ces constantes indépendantes de l'intensité lumineuse.

En insérant (4.37) dans (4.35), il vient <sup>5</sup> :

$$Q_c = K_X(1 - e^{-kt}) \quad (4.38)$$

### 4.2.3.2 Résultats expérimentaux

#### 4.2.3.2.1 Comparaison des différentes quinones

Les résultats expérimentaux sont représentés en figure 4.15. Les ajustements du modèle précédent (équation 4.38) ont été réalisés à l'aide du logiciel Origin (voir partie expérimentale). Il est possible d'obtenir les valeurs de  $K_X$  et de  $k$  facilement dans tous les cas sauf celui de la 2,6 DMBQ.

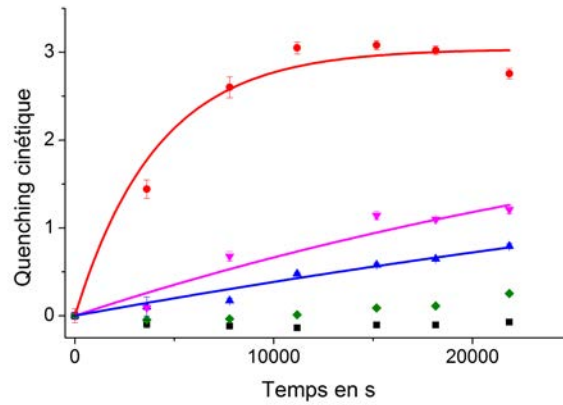


FIGURE 4.15: Quenching cinétique en fonction du temps d'exposition en secondes pour différentes quinones exogènes :PPBQ (cercles rouges), 2,5 DCBQ (triangles vers le bas roses), 2,6 DCBQ (triangles vert le haut bleu), 2,6 DMBQ (losanges verts), témoin (carrés noirs), ajustements par le modèle correspondant (ligne rouge, PPBQ  $Q_X = 3(1 - e^{-2,4 \cdot 10^{-4}t})r^2 = 0,96$ ), (ligne rose, 2,5-DCBQ  $Q_X = 3(1 - e^{-2,5 \cdot 10^{-5}t})r^2 = 0,95$ ), (ligne bleue, 2,6-DCBQ  $Q_X = 3(1 - e^{-1,4 \cdot 10^{-5}t})r^2 = 0,92$ ).

Le cas de la 2,6-DMBQ est singulier car si l'allure croissante de la courbe semble montrer qu'un phénomène de quenching cinétique est bel et bien à l'oeuvre, une distorsion de la courbe par rapport aux autres quinones apparait. Ceci est sans doute du à la valeur initiale du quenching qu'il faut réestimer.

---

5. Cela permet également de valider le raisonnement dans le cas d'une dénaturation non-isostoechiométrique. En effet cela engendrerait l'apparition d'une constante devant l'équation 4.37, insérable dans l'expression de la constante de quenching.

Pour cela, on peut écrire l'expression du quenching total, noté  $Q$  :

$$Q = Q_c + Q_{t=0} = Q_{t=0} + K_X(1 - e^{-kt}) \quad (4.39)$$

Il est alors possible de simuler l'évolution du quenching ce qui permet de déterminer l'expression de la constante de vitesse (figure 4.16). En pratique, aucune saturation n'est observée sur la courbe. En effet, le quenching reste très inférieur à la constante de quenching cinétique. Cela signifie que le produit  $kt$  doit être proche de 0. Dès lors, un simple développement limité permet de retrouver la linéarité de la courbe obtenue.

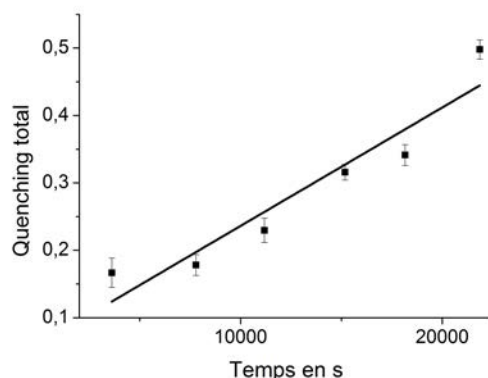


FIGURE 4.16: Quenching en fonction du temps d'exposition à 25  $\mu\text{M}$  introduits de 2,6-DMBQ, simulation linéaire correspondante ( $6,1 \cdot 10^{-2} + 1,8 \cdot 10^{-5} t$ ),  $r^2 = 0,96$

La pente est alors divisée par la constante de quenching cinétique pour donner la constante de vitesse  $k$ .

Un empoisonnement relativement rapide est observé dans le cas de la PPBQ. Cela se traduit par une stagnation du quenching cinétique aux temps longs, lorsque la réaction d'empoisonnement se termine, conduisant à une valeur du quenching cinétique égale à la constante de Stern-Volmer cinétique.

Les résultats ne permettent pas de distinguer des valeurs différentes de constante de quenching cinétique. De plus, on rappelle que son expression (4.34) est indépendante de la quinone considérée, dès lors que la réaction d'empoisonnement conduit à un quencheur identique selon une réaction de même rapport stoechiométrique.

Dès lors, la valeur obtenue dans le cas de la PPBQ doit constituer l'asymptote dans les autres cas et peut être fixée dans la simulation. Les courbes présentées sur la figure 4.15 sont issues de d'ajustements de modèle ainsi réalisées.

Une valeur de la constante de Stern-Volmer cinétique de  $3,0 \pm 0,1$  est obtenue. Le tableau 4.3 résume les différentes valeurs de  $k$  obtenues.

Poisons	$k \text{ (s}^{-1}\text{)}$
PPBQ	$2,4 \cdot 10^{-4} \pm 6 \cdot 10^{-5}$
2.5-DCBQ	$2,5 \cdot 10^{-5} \pm 2 \cdot 10^{-6}$
2.6-DCBQ	$1,37 \cdot 10^{-5} \pm 7,11 \cdot 10^{-5}$
2.6-DMBQ	$6 \cdot 10^{-6} \pm 1 \cdot 10^{-6}$

TABLE 4.3: Tableau récapitulatif des constantes de vitesses d'apparition de quenchneur cinétique par empoisonnement à différentes quinones

Comme attendu au vu des courbes, l'empoisonnement est bien plus rapide dans le cas de la PPBQ que des dérivés chlorés, eux mêmes empoisonnant plus vite que la 2,6-DMBQ.

#### 4.2.3.2.2 Etude de la 2,6-DCBQ en fonction de la concentration

La même expérience a été conduite en réalisant l'incubation avec différentes concentrations de 2,6-DCBQ. Les résultats sont représentés en figure 4.17.

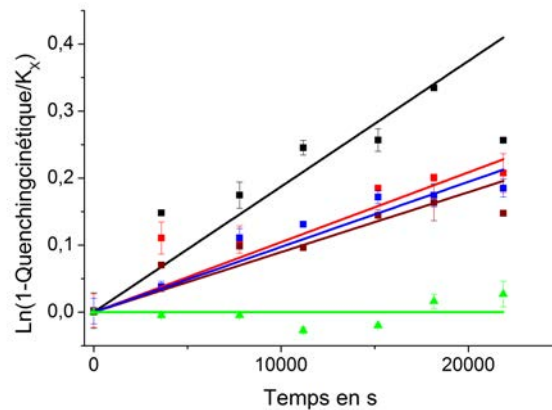


FIGURE 4.17: Transformée linéaire du quenching cinétique en fonction du temps d'exposition en heures à la 2,6-DCBQ à des concentrations de 100µM (carrés noirs), 75 µM (carrés rouges), 50 µM (carrés bleus), 25 µM (carrés marrons), témoin en absence de quinone (triangles verts), les ajustements linéaires correspondants sont tracés dans les mêmes couleurs.

Ces différents ajustements ont également permis d'extraire les constantes de vitesse à chaque concentration (tableau 4.4). Le cas du témoin est traité à l'aide d'une droite



de pente nulle. Les incertitudes présentées correspondent aux erreurs standards sur 3 mesures.

Concentration en $\mu\text{M}$	$10^5 k \text{ (s}^{-1}\text{)}$
100	$1,9 \pm 0,2$
75	$1,0 \pm 0,2$
50	$0,97 \pm 0,08$
25	$0,90 \pm 0,04$
témoin	$0 \pm 0.01$

TABLE 4.4: Tableau récapitulatif des constantes de vitesses d'apparition de quenchneur cinétique par empoisonnement à différentes concentrations de 2,6-DCBQ

En conclusion, il est visible que le quenching cinétique nécessite la présence de la 2,6-DCBQ, et que la constante de vitesse apparente augmente avec la concentration. Cela peut signifier que l'action de la quinone au sein de ce processus se produise à l'intérieur d'un compartiment insaturable, ou que ce processus induise une consommation de quinones de cinétique non-négligeable devant la vitesse d'internalisation de la quinone.

#### 4.2.3.3 Evolution de la proportion de sites ouverts

La proportion de sites ouverts a également été calculée en fonction du temps (figures 4.18 et 4.19). Sur la figure 4.18 la proportion de sites ouverts normalisée par sa valeur moyenne a été représentée au cours du temps pour les différentes quinones.

Il apparaît que seuls les dérivés chlorés semblent présenter une réelle évolution de la proportion de sites ouverts au cours du temps, alors que toutes les quinones étudiées présentent également un quenching cinétique. Cette évolution est particulièrement marquée dans le cas de la 2,6-DCBQ, pour laquelle une étude en fonction de la concentration a donc été réalisée. Si l'on suppose une loi de vitesse d'ordre 1, une évolution linéaire du logarithme est attendue.

$$\phi = \phi_0 e^{-k't} \quad (4.40)$$

Ces différentes simulations ont permis d'extraire les constantes de vitesse à chaque

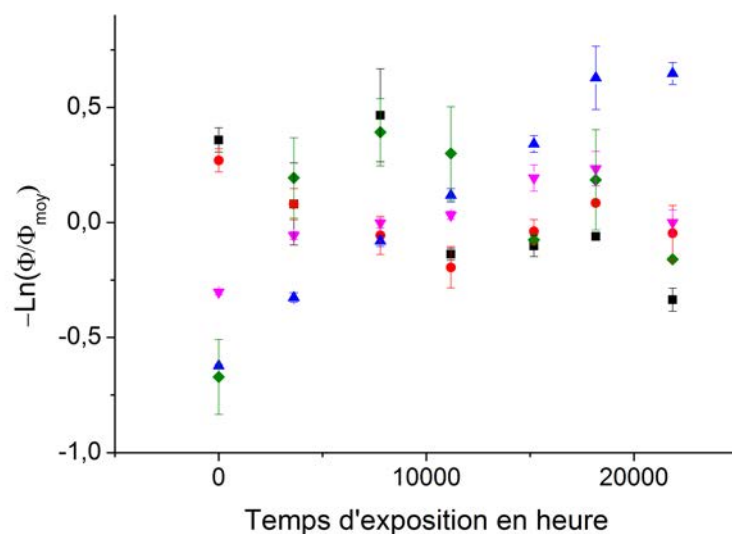


FIGURE 4.18: Evolution du logarithme de la proportion de sites ouvert normalisée par sa valeur moyenne en fonction du temps d'exposition en heures, témoin (carrés noirs) cas de la PPBQ (losanges rouges), cas de la 2,5 DCBQ (triangles vers le bas roses), cas de la 2,6 DCBQ (triangles bleus), cas de la 2,6 DMBQ (losanges verts).

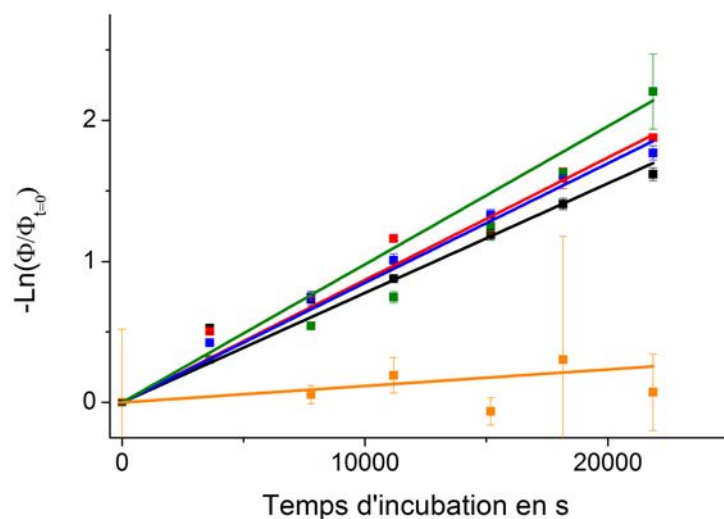


FIGURE 4.19: Evolution du logarithme de la proportion de sites ouvert normalisée par sa valeur initiale en fonction du temps d'exposition en heures à la 2,6-DCBQ à des concentrations de 100  $\mu\text{M}$  (carrés noirs), 75  $\mu\text{M}$  (carrés rouges), 50  $\mu\text{M}$  (carrés bleus), 25  $\mu\text{M}$  (carrés verts), témoin en absence de quinone carrés oranges, les ajustements linéaires correspondants sont tracés dans les mêmes couleurs avec des  $r^2$  respectifs de 0,989, 0,996, 0,996, 0,992.

concentration (tableau 4.5). Le cas du témoin est traité à l'aide d'une droite de pente nulle. Les incertitudes présentées correspondent aux erreurs standards sur 3 mesures.

Concentration en $\mu\text{M}$	$10^5 k \text{ (s}^{-1}\text{)}$
100	$7,8 \pm 0,3$
75	$8,7 \pm 0,2$
50	$8,5 \pm 0,2$
25	$9,8 \pm 0,3$
témoin	$0 \pm 0,5$

TABLE 4.5: Tableau récapitulatif des constantes de vitesses de diminution de la proportion de sites ouverts par empoisonnement à différentes concentrations de 2,6-DCBQ

En conclusion, nous avons montré que si la baisse de la proportion de sites ouverts nécessite la présence de la 2,6-DCBQ, aucune dépendance de la concentration n'apparaît clairement après 25  $\mu\text{M}$ . Cela peut s'expliquer de 2 manières : une saturation en quinone du compartiment responsable de ce phénomène ou bien un mécanisme dont l'étape cinétiquement limitante ne fait pas intervenir la quinone.

Il est également observable que la cinétique de décroissance de la proportion de sites ouverts est plus rapide que celle d'apparition du quenching photochimique. Cela peut s'expliquer de différentes façons. Le quenching et la baisse de la proportion de sites ouverts peuvent être des événements indépendants, ce qui expliquerait que le quenching ait lieu avec toutes les quinones contrairement à la baisse de la proportion de sites ouverts. Ainsi, une dégradation de la quinone pourrait expliquer, qualitativement, la baisse de la proportion de sites ouverts mais pas la baisse de la fluorescence au niveau du pulse. Il est également possible d'envisager une dégradation de la protéine D conduisant à l'apparition du quencheur et éventuellement à l'impossibilité d'effectuer un transfert d'électron. La différence de constante de vitesse signifierait que dans le processus de génération du quencheur la dégradation de la protéine serait suivie d'autres étapes de cinétique non négligeables.

#### 4.2.3.4 Evolution des photocourants au cours du temps : cas de la 2,6-DCBQ

Plusieurs cycles lumineux jour/nuit ont donc été réalisés pour observer l'évolution des photocourants dans le temps. Ainsi, est représentée en figure 4.20 l'évolution du photocourant dans le temps dans le cas de la 2,6-DCBQ à un flux lumineux incident de  $340 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ .

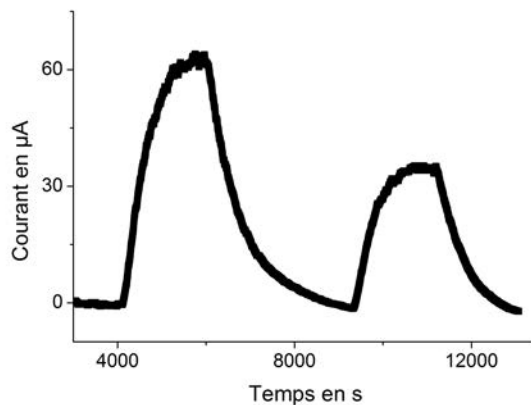


FIGURE 4.20: Courant en fonction du temps à un potentiel de travail de 650 mV/AgAgCl sur une suspension de mutants PetA ( $\Delta b_6f$ ) à une concentration de l'ordre de  $10^7$  cellules par mL au fil de différents cycles jour/nuit (flux lumineux incident de  $340 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ ), en présence de 2,6-DCBQ à 100  $\mu\text{M}$ .

Une baisse du photocourant d'un facteur environ égal à 2 est donc observée dans ces conditions. Cette baisse peut s'expliquer par deux phénomènes a priori : l'empoisonnement et la photoinhibition. Pour essayer de discriminer ces deux phénomènes, les photocourants ont été enregistrés à la même concentration en quinone, mais à une intensité lumineuse plus faible (figure 4.21).

Là encore, une baisse de l'intensité du même facteur est observée. Cela peut signifier deux choses. La baisse du courant peut être entièrement contrôlée par le phénomène d'empoisonnement ou bien la modification du flux lumineux incident n'induit pas de modification significative de l'influence de la photoinhibition. Cette dernière hypothèse est rendue peu probable par la forte dépendance du courant vis à vis de l'intensité lumineuse. Néanmoins, la concentration en quinone a été modifiée dans certaines expériences (figure 4.22). En effet, ce paramètre ne doit pas influencer drastiquement la vitesse de l'empoisonnement, comme dit précédemment (dépendance vis à vis du quenching mais pas vis

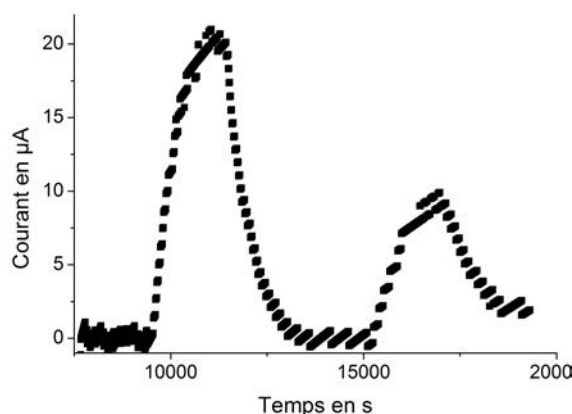


FIGURE 4.21: Courant en fonction du temps à un potentiel de travail de 650 mV/AgAgCl sur une suspension de mutants PetA ( $\Delta b_6f$ ) à une concentration de l'ordre de  $10^7$  cellules par mL au fil de différents cycles jour/nuit (flux lumineux incident de  $135 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ ), en présence de 2,6-DCBQ à 100  $\mu\text{M}$ .

à vis de la proportion de sites ouverts), mais pourrait accélérer la photoinhibition, via une proportion de sites ouverts plus faible. De plus, le second pic a été lancé légèrement moins longtemps avant le premier, pour laisser moins de temps à l'empoisonnement de se produire. Un empoisonnement dominant devrait donc se traduire par une baisse moins forte du courant (en proportion) alors que dans le cas d'une photoinhibition effectivement dominante, le courant devrait diminuer nettement plus.

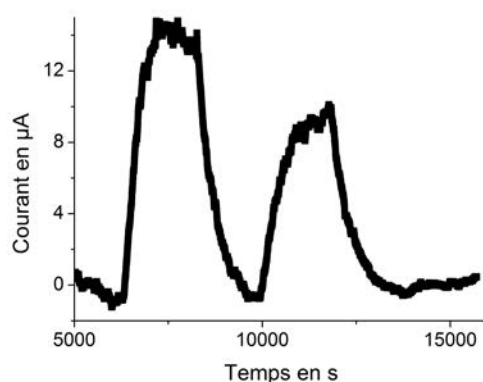


FIGURE 4.22: Courant en fonction du temps à un potentiel de travail de 650 mV/AgAgCl sur une suspension de mutants PetA ( $\Delta b_6f$ ) à une concentration de l'ordre de  $10^7$  cellules par mL au fil de différents cycles jour/nuit (flux lumineux incident de  $135 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ ), en présence de 2,6-DCBQ à 75  $\mu\text{M}$ .

Une baisse proportionnellement moins grande du courant maximal est observée dans ce cas, ce qui est cohérent avec une dominance de la baisse du courant par le phénomène d’empoisonnement. De plus, il est à noter qu’une baisse de l’ordre de 50% pour des cycles séparés d’environ 5000 s est cohérente (en ordre de grandeur) avec les constantes de vitesses observées lors de l’étude du phénomène d’empoisonnement par fluorescence, sans exclure une contribution de la photoinhibition<sup>6</sup>.

La discrimination entre ces deux phénomènes reste cependant délicate dans le cas de la 2,6-DCBQ. Elle devrait pouvoir être effectuée plus facilement dans le cas de la PPBQ, dont le phénomène d’empoisonnement montrait un comportement asymptotique.

#### 4.2.3.5 Evolution des photocourants au cours du temps : cas de la PPBQ

Il est intéressant d’essayer d’observer l’évolution dans le temps des photocourants avec la PPBQ (figure 4.23), dont le phénomène d’empoisonnement est sensiblement différent de celui observé avec la 2,6-DCBQ. En effet, l’empoisonnement ne se traduit pas par une baisse de la proportion de sites ouverts. Seul le quenching cinétique se produit alors, et semble converger vers sa valeur asymptotique égale à la constante de quenching en un temps relativement court (entre 2 et 3 heures) par rapport aux gammes de temps d’incubation mises en jeu en électrochimie (de l’ordre de 10 heures dans le cas de la figure 4.23).

Même si le quenching cinétique a un impact sur le photocourant, ce qui n’est pas évident considérant que son impact sur la proportion de sites ouverts semble négligeable, il ne peut à lui seul expliquer la variation des photocourants obtenus. En effet, ce quenching atteint sa valeur maximale au bout d’un temps bien plus court que l’expérience d’électrochimie réalisée (2-3 h), temps pendant lequel aucune expérience d’électrochimie n’a été réalisée. Ainsi, la valeur asymptotique du quenching cinétique correspond à une baisse maximale de la fluorescence maximale d’un facteur 2. En supposant une absence complète de limitations du courant que ce soit par l’accessibilité du site réactionnel pour

---

6. Il est délicat de réaliser cette comparaison d’une manière réellement précise dans la mesure où le phénomène d’empoisonnement n’est pas clairement expliqué. La correspondance entre les cinétiques alors observées et la baisse de la valeur maximale du photocourant est donc délicate à effectuer. Néanmoins, si les constantes de vitesse de quenching cinétique et d’effondrement de la proportion de sites ouverts sont grossièrement sommées, une baisse d’environ 40% est attendue après 5000 s.

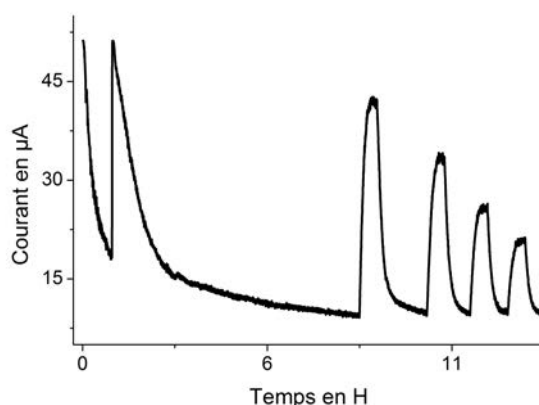


FIGURE 4.23: Courant en fonction du temps à un potentiel de travail de 650 mV/AgAgCl sur une suspension de mutants PetA ( $\Delta b_6f$ ) à une concentration de l'ordre de  $10^7$  cellules par mL au fil de différents cycles jour/nuit, en présence de PPBQ à 100  $\mu\text{M}$ , pour un flux de photons incident de  $340 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ .

la quinone, de cinétique de transfert d'électron entre la chaîne photosynthétique et de régénération électrochimique, le quenching cinétique ne pourrait expliquer qu'une baisse du courant d'un facteur 2 au pire. Or la baisse des photocourants observée est bien plus importante. Les phénomènes de photoinhibition semblent donc expliquer cette décroissance.

Pour valider cette hypothèse, les photocourants ont été observés sur un temps d'incubation plus court, avec une vitesse photochimique plus faible, (ce qui peut s'observer puisque les valeurs de photocourants sont plus faibles) produisant donc moins de photoinhibition. Les résultats sont présentés en figure 4.24.

Le premier échelon de courant observé est d'une intensité plus importante (de l'ordre de 15  $\mu\text{A}$ ) que les suivants, qui semblent eux mêmes d'intensités voisines (de l'ordre de 10  $\mu\text{A}$ ). Le fait que les pics suivants soient d'intensités similaires signifie que la photoinhibition (au sens macroscopique du terme) semble avoir atteint son état d'équilibre, c'est à dire que la cinétique de photoinhibition, au sens microscopique, est alors égale à la cinétique de photoréparation.

La baisse du courant entre le premier pulse et les suivants peut s'expliquer sur la base de l'effet poison précédemment décrit. En effet, le premier pic se produit pendant la gamme de temps dans laquelle l'empoisonnement se produit. Il est donc logique d'observer une différence d'intensité entre le premier pic et les suivants. Il est également logique que

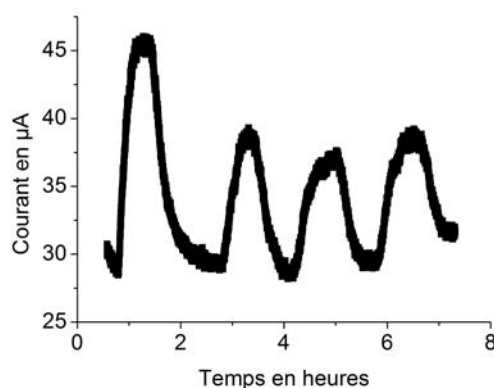


FIGURE 4.24: Courant en fonction du temps à un potentiel de travail de 650 mV/AgAgCl sur une suspension de mutants PetA ( $\Delta b_6f$ ) à une concentration de l'ordre de  $10^7$  cellules par mL au fil de différents cycles jour/nuit

l'empoisonnement ne provoque pas de variation d'intensité significative entre les pulses suivants, puisque l'empoisonnement a alors atteint sa valeur asymptotique. Ce raisonnement ne permet toutefois pas d'éliminer qualitativement toute influence de la photoinhibition sur la baisse du courant observée entre les deux premiers pics. Néanmoins, on peut rappeler que la valeur asymptotique du quenching cinétique était d'environ 1 et qu'il valait environ 0,5 au bout d'une heure d'incubation. Si l'on suppose une corrélation linéaire directe entre le quenching cinétique et la valeur stationnaire du photocourant, par l'intermédiaire de la vitesse photochimique, les pics observés après une longue incubation doivent avoir une valeur divisée par 2 par rapport au pic mesuré en absence d'incubation<sup>7</sup>. Une valeur de l'ordre de 20  $\mu\text{A}$  serait donc attendue en absence d'incubation. La valeur du photocourant pour le premier pic est donc globalement cohérente avec l'effet de l'empoisonnement. Tout cela laisse donc à penser que l'évolution dans le temps du courant dans ces conditions semble contrôlée par l'empoisonnement.

---

7. Ceci est en fait une valeur fictive correspondant à un cas limite irréalisable en pratique. En effet, au vu de la cinétique de l'empoisonnement par rapport au temps de réponse de ce dispositif électrochimique, il est impossible d'enregistrer un photocourant en absence d'incubation.



## 4.3 Conclusion

Dans ce chapitre, nous avons pu mettre en évidence la faisabilité d'un transfert d'électrons médié via des médiateurs de type quinone entre notre modèle cellulaire, l'algue *Chlamydomonas reinhardtii*, et une électrode de toile de carbone de grande surface spécifique. Toutefois, la comparaison de nos résultats avec ceux de la littérature reste difficile en raison d'une différence de nature du système biologique (algue entière, membranes thylakoïdes isolées, photosystèmes I ou II, etc...) , des conditions expérimentales (cellules en suspension avec agitation, systèmes adhérents sur l'électrode, etc...). On remarquera toutefois à minima que les ordres de grandeurs de photocourants obtenus sont cohérents avec ceux résultant d'autres stratégies rapportées dans la littérature.

Pour ce qui est des conditions de nos études, une dégradation du système dans le temps a été constatée et des hypothèses expliquant cette dégradation (empoisonnement et photoinhibition) ont été avancées et discutées sur la base d'observations expérimentales.

Des éléments théoriques ont été également mis en œuvre. Ils ont permis une analyse qualitative des résultats. Cependant un processus de dégradation sur des échelles de temps longues compliquant par lui-même l'analyse, ce type de système ne permet pas une application quantitative du modèle mis en place.

Il apparaît donc nécessaire de développer une procédure expérimentale avec un temps de réponse plus court, permettant de s'affranchir des phénomènes de dégradation cellulaire observés. Ceci pourrait permettre alors de valider quantitativement les éléments théoriques développés ici, ce qui offrirait des outils d'étude plus précis des phénomènes de dégradation susmentionnés.



# Conclusion générale

Les objectifs de ce travail étaient de dériver les électrons du processus photosynthétique en amont du complexe  $b_6f$  afin d'une part, de chercher à minimiser les phénomènes de photoinhibition observés sous forte irradiation et d'autre part d'en tirer profit pour générer des photocourants. En effet, dans ces conditions, l'excès d'électrons dû à la saturation de l'efficacité des transferts d'électrons dans le  $b_6f$  entraîne la photoinhibition.

Des expériences de fluorescence ont été menées, et démontrent que des médiateurs électrochimiques de type quinone permettent d'assurer cette fonction de dérivation électronique, avec une efficacité variable selon la nature des substituants. Ceux-ci modulent en effet l'efficacité de la quinone, tant d'un point de vue de l'accessibilité de la quinone au site réactionnel que de la cinétique de transfert d'électrons. Il a été montré que des phénomènes non attendus étaient à prendre en compte, tels que des phénomènes de "perte" de quinones dans différents compartiments cellulaires (non clairement identifiés). De plus, il a été montré que les résultats expérimentaux étaient cohérents avec un mécanisme inspiré de la littérature.

Un tel système n'étant intrinsèquement pas pérenne dans le temps, à cause de la consommation de la quinone, une régénération électrochimique de la quinone photoréduite a été envisagée. Après avoir montré par des études électrochimiques classiques que toutes les quinones étudiées étaient facilement oxydables dans des conditions usuelles, la faisabilité du transfert d'électron médié a été démontrée par chronoampérométrie, à l'échelle préparative (électrode de grande surface spécifique).

Bien que ces résultats restent difficiles à comparer avec ceux d'autres études, tant la nature des systèmes diffère en fonction des stratégies de récupération, les photocourants obtenus sont de même ordre de grandeur que ceux déjà publiés.

Des éléments théoriques ont également été avancés pour guider l'analyse des résultats.

Néanmoins, une évolution du système dans le temps due, a priori, à des phénomènes de photoinhibition et d'empoisonnement viennent compliquer cette dernière. Seule une comparaison qualitative avec les éléments théoriques a donc pu être effectuée.

Par conséquent, le développement d'un système en milieu confiné est à l'étude au laboratoire. En effet, la réduction du volume devrait permettre un temps de réponse plus faible. Ceci pourrait permettre de s'affranchir de l'évolution du système dans le temps, et donc de pouvoir confronter quantitativement les résultats expérimentaux aux prédictions théoriques.

Cette confrontation est la première étape d'une grande étude d'intérêt biologique. En effet, la validation du modèle théorique sur un système biologique intact pourrait, par suite, permettre de chercher à étendre le modèle aux temps longs, et donc de pouvoir étudier les phénomènes de photoinhibition et d'empoisonnement.

Dans ce but, la miniaturisation du dispositif pourrait conduire à l'élaboration d'un dispositif couplé électrochimie/fluorescence. Ceci pourrait permettre une analyse plus fine de l'évolution du système dans le temps. En effet, ces deux méthodes analytiques donnent des informations complémentaires. La fluorescence fournit en effet des informations sur l'état du système biologique (état d'oxydation des accepteurs d'électrons, efficacité de la séparation de charges), alors que l'électrochimie donne une vision de vitesse globale du processus.

De manière plus générale, d'autres études peuvent également être envisagées concernant la nature de l'objet biologique lui-même. On citera par exemple les études sur protoplaste (cellule dont la paroi a été supprimée), voire sur chloroplastes isolés. Comparée à des expériences témoins, en fluorescence comme en électrochimie, sur cellule intacte, ceci offrirait la possibilité de quantifier la limitation de la cinétique du processus due à la traversée de la paroi de la cellule, et de limiter les pertes de quinones.

# Partie expérimentale

Les quinones utilisées dans cette étude ont toutes été achetées chez Sigma Aldrich et utilisées sans purification supplémentaire.

## Mesure de l'efficacité des quinones sur la dérivation électronique

### Culture cellulaire

Dans ce travail, l'algue unicellulaire *Chlamydomonas Reinhardtii* a été utilisée, sous sa forme sauvage ainsi que sous la forme de mutants sans complexe  $b_6f$  de type PetA [138] ou f1. Ces cellules ont été cultivées dans du milieu Tris Acétate Phosphate (TAP) constitué de Tris (20 mmol.L<sup>-1</sup>), NH<sub>4</sub>Cl (7 mmol.L<sup>-1</sup>), MgSO<sub>4</sub> (0,83 mmol.L<sup>-1</sup>), CaCl<sub>2</sub> (0,45 mmol.L<sup>-1</sup>),  $K_2HPO_4$  (1,65 mmol.L<sup>-1</sup>),  $KH_2PO_4$  (1,05 mmol.L<sup>-1</sup>) à 25 °C sous des conditions d'illumination douces (environ 50  $\mu E.m^{-2}.s^{-1}$ ).

### Préparation de la solution

Les quinones ont été dissoutes dans de l'éthanol absolu à des concentrations de l'ordre de 10 mmol.L<sup>-1</sup>. De petits volumes appropriés (pour atteindre la concentration voulue) de ces solutions ont été introduits directement dans une cuve UV contenant 2 mL de la suspension d'algues. Les cuves ont ensuite été agitées manuellement avant de réaliser les mesures.

## Mesures de fluorescence

Les mesures de fluorescence ont été obtenues en utilisant un spectrophotomètre JTS (Biologic). La fluorescence détectée est provoquée par de courts flashes lumineux (d'une durée de 4  $\mu$ s) et d'une intensité suffisamment faible pour avoir un effet actinique négligeable. Ces flash sont fournis par une LED blanche, la longueur d'onde étant sélectionnée par la combinaison de 2 filtres de 3 mm BG39 et BG3 (Schott filters). La lumière actinique est fournie par une LED rouge à 640 nm. La fluorescence maximale est mesurée 100  $\mu$ s après un pulse de lumière saturante de 250 ms induisant une réduction complète de tous les accepteurs d'électrons.

## Caractérisation électrochimique des quinones

L'étude du comportement électrochimique des quinones en absence d'algues (présentée au chapitre 3) a été réalisée dans du PBS (Life Technologies, 18912-014 sous forme de tablettes à dissoudre dans 500 mL d'eau pure (KCl (2,68 mM), NaCl (140 mM), phosphates de sodium (10 mM)), à un pH de 7,4. Un montage à 3 électrodes a été utilisé avec un potentiostat Autolab PGSTAT 20. L'électrode de référence utilisée est une électrode au calomel saturé (ECS), et la contre-électrode un fil de platine. Une électrode de carbone de 3 mm de diamètre a été utilisée comme électrode de travail. Les mesures de nombre d'électrons ont nécessité l'utilisation d'une électrode à disque tournant EDI 101, associée à son contrôleur de vitesse CTV 101, de chez Radiometer Analytical. L'embout dont l'électrode tournante a été équipée est un disque de carbone vitreux d'un diamètre de 3 mm.

## Extraction de photocourants

### Préparation du milieu expérimental

Les expériences d'extraction de photocourant ici présentées ont été réalisées en utilisant du TAP de force ionique augmentée par l'ajout de 7,4 % d'un PBS concentré (6,66 fois plus concentré que le PBS normal, ce qui permet de moins diluer le milieu biolo-

gique). Le changement de milieu des cellules a été effectué par centrifugation à 4000 rpm pendant 5 minutes, puis redispersion des cellules dans le nouveau milieu, pour atteindre une concentration voisine des  $10^7$  cellules par mL de solution.

## Montage expérimental

La cellule utilisée est constituée d'une cuve spectroscopique classique en pyrex surmontée d'une cellule électrochimique en verre réalisée à l'atelier de soufflage de verre de l'ENS et est visible en figure 4.25.



FIGURE 4.25: Photo de la cellule photoélectrochimique utilisée

Un dispositif de double agitation (agitation magnétique par le bas et mécanique par le haut) est utilisé expérimentalement pour éviter les phénomènes de sédimentation, homogénéiser la solution et réduire l'épaisseur de la couche stagnante.

L'électrode de travail utilisée est une toile de carbone de surface géométrique centimétrique et de haute porosité. Un fil d'Ag/AgCl est utilisé en électrode de référence. Un fil de platine placé dans une allonge (remplie du milieu sans algues ni quinones pour éviter tout phénomène de type générateur collecteur) reliée à la suspension d'algues par un fritté constitue la contre électrode.

Les différentes électrodes sont reliées à un potentiostat Quadstat permettant de faire de la chronoampérométrie. L'irradiation est effectuée de la même manière que pour les mesures de fluorescence.

## Procédure expérimentale

A l'obscurité, le potentiel est appliqué à l'électrode de travail en présence de la suspension d'algues en absence de quinones. Ceci permet l'obtention d'un courant capacitif de grande constante de temps, dû à la grande surface spécifique de l'électrode. Puis les quinones, (dissoutes dans l'éthanol) sont ajoutées à la solution, conduisant à une hausse du courant, probablement dû à l'activité mitochondriale. Enfin la lumière est activée à l'aide du spectrophotomètre. L'acquisition de l'échelon de courant ne s'achève, que lorsqu'un retour à la ligne de base semble correctement observé.

## Traitements de données et simulations

Les résultats expérimentaux ont été représentés graphiquement à l'aide du logiciel OriginPro 8.1 (OriginLab Company, Northampton, MA 01060, USA). Ce logiciel a également été utilisé pour réaliser les ajustements des modèles aux données. Les graphiques 3D et les diagrammes de zones ont été tracés à partir du logiciel Mathématique [139] qui a également été utilisé pour la simulation de données.



# Bibliographie

- [1] <http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Chloroplast.svg>.
- [2] [http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Thylakoid\\_membrane\\_3.svg](http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Thylakoid_membrane_3.svg).
- [3] M.F. Hohmann-Marriott and R.E. Blankenship. *The photosynthetic World*, pages 3–32. Springer, Dordrecht Heidelberg London New-York, 2012.
- [4] G. Renger. *Photosynthetic Water splitting : Apparatus and Mechanism*. Springer, Dordrecht Heidelberg London New-York, 2012.
- [5] T. Kallas. *Cytochrome  $b_6f$  Complex at the Heart of Energy Transduction and Redox Signaling*, chapter 21, pages 501–560. 2012.
- [6] P. Joliot and A. Joliot. Electron transfer between photosystem II and the cytochrome $b_6f$  complex : mechanistic and structural implications. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1102(1) :53–61, 1992.
- [7] Govindjee and J. J. Eatonrye. Electron-transfer through photosystem-II acceptors - interaction with anions. *Photosynthesis Research*, 10(3) :365–379, 1986.
- [8] A. R. Crofts. The Q-cycle - a personal perspective. *Photosynthesis Research*, 80(1-3) :223–243, 2004.
- [9] A. R. Crofts, S. W. Meinhardt, K. R. Jones, and M. Snozzi. The role of the quinone pool in the cyclic electron-transfer chain of rhodospseudomonas sphaeroides A modified Q-cycle mechanism. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 723(2) :202–218, 1983.
- [10] P. Mitchell. The protonmotive Q cycle : A general formulation. *Febs Letters*, 59(2) :137–139, 1975.
- [11] P. Mitchell. Possible molecular mechanisms of the protonmotive function of cytochrome systems. *Journal of Theoretical Biology*, 62(2) :327–367, 1976.

- [12] P. Joliot and A. Joliot. Mechanism of electron-transfer in the cytochrome  $b_6f$  complex of algae - evidence for a semiquinone cycle. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91(3) :1034–1038, 1994.
- [13] P. Joliot and A. Joliot. In vivo analysis of the effect of dicyclohexylcarbodiimide on electron and proton transfers in cytochrome  $b_6f$  complex of *Chlorella sorokiniana*. *Biochemistry*, 37(29) :10404–10410, 1998.
- [14] G. Finazzi. Redox-coupled proton pumping activity in cytochrome  $b_6f$ , as evidenced by the pH dependence of electron transfer in whole cells of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Biochemistry*, 41(23) :7475–7482, 2002.
- [15] J. Farineau and J-F. Morot-Gaudry. *La photosynthèse Processus physiques, moléculaires et physiologiques*. Editions QUAE, Versailles, 2011.
- [16] J.L. Cape, M.K. Bowman, and D.M. Kramer. Understanding the cytochrome bc complexes by what they don't do. the Q-cycle at 30. *Trends in Plant Science*, 11(1) :46–55, 2006.
- [17] N. Allahverdiyeva and E.-M. Aro. *Photosynthetic Responses of Plants to Excess Light : Mechanisms and Conditions for Photoinhibition, Excess Energy Dissipation and Repair*. Springer, Dordrecht Heidelberg London New-York, 2012.
- [18] I. Ohad, N. Adir, H. Koike, D.J. Kyle, and Y. Inoue. Mechanism of photoinhibition in vivo. a reversible light-induced conformational change of reaction center II is related to an irreversible modification of the D1 protein. *Journal of Biological Chemistry*, 265(4) :1972–1979, 1990.
- [19] G. X. Chen, J. Kazimir, and G. M. Cheniae. Photoinhibition of hydroxylamine-extracted photosystem-II membranes - studies of the mechanism. *Biochemistry*, 31(45) :11072–11083, 1992.
- [20] R.J. Debus. Amino acid residues that modulate the properties of tyrosine YZ and the manganese cluster in the water oxidizing complex of photosystem II. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1503 :164–186, 2001.
- [21] C. Jegerschoeld and S. Styring. Spectroscopic characterization of intermediate steps involved in donor-side-induced photoinhibition of photosystem II. *Biochemistry*, 35(24) :7794–7801, 1996.

- [22] C. Jegerschoeld, I. Virgin, and S. Styring. Light-dependent degradation of the D1 protein in photosystem ii is accelerated after inhibition of the water splitting reaction. *Biochemistry*, 29(26) :6179–6186, 1990.
- [23] A. Krieger-Liszkay and A.W. Rutherford. Influence of herbicide binding on the redox potential of the quinone acceptor in photosystem II : Relevance to photodamage and phytotoxicity. *Biochemistry*, 37(50) :17339–17344, 1998.
- [24] F. Rappaport, M. Guergova-Kuras, P. J. Nixon, B. A. Diner, and J. Lavergne. Kinetics and pathways of charge recombination in photosystem II. *Biochemistry*, 41(26) :8518–8527, 2002.
- [25] M. Hakala, I. Tuominen, M. Keränen, T. Tyystjärvi, and E. Tyystjärvi. Evidence for the role of the oxygen-evolving manganese complex in photoinhibition of photosystem II. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1706 :68–80, 2005.
- [26] N. Ohnishi, S.I. Allakhverdiev, S. Takahashi, S. Higashi, M. Watanabe, Y. Nishiyama, and N. Murata. Two-step mechanism of photodamage to photosystem II : Step 1 occurs at the oxygen-evolving complex and step 2 occurs at the photochemical reaction center. *Biochemistry*, 44(23) :8494–8499, 2005.
- [27] I. Vass, S. Styring, T. Hundal, A. Koivuniemi, E. M. Aro, and B. Andersson. Reversible and irreversible intermediates during photoinhibition of photosystem .2. stable reduced qa species promote chlorophyll triplet formation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 89(4) :1408–1412, 1992.
- [28] A. Koivuniemi, E. Swiezewska, E.-M. Aro, S. Styring, and B. Andersson. Reduced content of the quinone acceptor  $Q_A$  in photosystem ii complexes isolated from thylakoid membranes after prolonged photoinhibition under anaerobic conditions. *Febs Letters*, 327(3) :343–346, 1993.
- [29] R.V. Danielius, K. Satoh, P.J. M. van Kan, J.J. Plijter, A. M. Nuijs, and H.J. Van Gorkom. The primary reaction of photosystem II in the D1-D2-cytochrome b-559 complex. *Febs Letters*, 213(2) :241–244, 1987.

- [30] J. R. Durrant, L. B. Giorgi, J. Barber, D. R. Klug, and G. Porter. Characterisation of triplet states in isolated photosystem II reaction centres : Oxygen quenching as a mechanism for photodamage. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1017(2) :167–175, 1990.
- [31] É Hideg, K. Tamás, K. án Hideg, and I. Vass. Do oxidative stress conditions impairing photosynthesis in the light manifest as photoinhibition ? *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B : Biological Sciences*, 355(1402) :1511–1516, 2000.
- [32] Imre Vass. Role of charge recombination processes in photodamage and photoprotection of the photosystem II complex. *Physiologia Plantarum*, 142(1) :6–16, 2011.
- [33] E.-M. Aro, I. Virgin, and B. Andersson. Photoinhibition of photosystem II. inactivation, protein damage and turnover. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1143(2) :113–134, 1993.
- [34] A.J. McCormick, P. Bombelli, R. W. Bradley, R. Thorne, T. Wenzel, and C.J. Howe. Biophotovoltaics : oxygenic photosynthetic organisms in the world of bioelectrochemical systems. *Energy Environ. Sci.*, 8 :1092–1109, 2015.
- [35] W. Ryu, S.-J. Bai, J.S. Park, Z. Huang, J. Moseley, T. Fabian, R. J. Fasching, A.R. Grossman, and F. B. Prinz. Direct extraction of photosynthetic electrons from single algal cells by nanoprobng system. *Nano Letters*, 10(4) :1137–1143, 2010.
- [36] K. H. Sjoeholm, M. Rasmussen, and S.D. Minter. Bio-solar cells incorporating catalase for stabilization of thylakoid bioelectrodes during direct photoelectrocatalysis. *Ecs Electrochemistry Letters*, 1(5) :G7–G9, 2012.
- [37] M. Rasmussen, A. Shrier, and S.D. Minter. High performance thylakoid bio-solar cell using laccase enzymatic biocathodes. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 15(23) :9062–9065, 2013.
- [38] M. Rasmussen and S.D. Minter. Self-powered herbicide biosensor utilizing thylakoid membranes. *Analytical Methods*, 5(5) :1140–1144, 2013.
- [39] M. Purcell, R. Carpentier, D. Belanger, and G. Fortier. Immobilized plant thylakoid membranes as a biosensor for herbicides. *Biotechnology Techniques*, 4(5) :363–368, 1990.

- [40] A.J. McCormick, P. Bombelli, A.M. Scott, A.J. Philips, A.G. Smith, A.C. Fisher, and C.J. Howe. Photosynthetic biofilms in pure culture harness solar energy in a mediatorless bio-photovoltaic cell (bpv) system. *Energy Environ. Sci.*, 4 :4699–4709, 2011.
- [41] P. Bombelli, T. Müller, T.W. Herling, C.J. Howe, and T. P.J. Knowles. A high power-density, mediator-free, microfluidic biophotovoltaic device for cyanobacterial cells. *Advanced Energy Materials*, 5(2) :n/a–n/a, 2015.
- [42] K. A. Ahrling and S. Peterson. Light-adaptation of photosystem II is mediated by the plastoquinone pool. *Biochemistry*, 42(25) :7655–7662, 2003.
- [43] G. Ananyev, G. Renger, U. Wacker, and V. Klimov. The photoproduction of superoxide radicals and the superoxide-dismutase activity of photosystem-II - the possible involvement of cytochrome b559. *Photosynthesis Research*, 41(2) :327–338, 1994.
- [44] G. Chen, G. Han, E. Göransson, F. Mamedov, and S. Styring. Stability of the s3 and s2 state intermediates in photosystem II directly probed by EPR spectroscopy. *Biochemistry*, 51(1) :138–148, 2011.
- [45] B. A. Diner and V. Petrouleas. Light-induced oxidation of the acceptor-side Fe(II) of photosystem-II by exogenous quinones acting through the  $Q_B$  binding-site .2. blockage by inhibitors and their effects on the FE(III) electron-paramagnetic-respectra. *Biochimica et Biophysica Acta*, 893(2) :138–148, 1987.
- [46] H. M. Gleiter, E. Haag, Y. Inoue, and G. Renger. Functional-characterization of a purified homogeneous photosystem-II core complex with high oxygen evolution capacity from spinach. *Photosynthesis Research*, 35(1) :41–53, 1993.
- [47] E. Haag, H. M. Gleiter, and G. Renger. Effects of photoinhibition on the ps-II acceptor side including the endogenous high-spin  $Fe^{2+}$  in thylakoids, ps-ii-membrane fragments and ps-ii core complexes. *Photosynthesis Research*, 31(2) :113–126, 1992.
- [48] K. M. Halverson and B. A. Barry. Sucrose and glycerol effects on photosystem II. *Biophysical Journal*, 85(2) :1317–1325, 2003.
- [49] S. Izawa. [39] *Acceptors and donors and chloroplast electron transport*, volume Volume 69, pages 413–434. Academic Press, Amsterdam, 1980.

- [50] D. Joly and R. Carpentier. The oxidation/reduction kinetics of the plastoquinone pool controls the appearance of the i-peak in the o-j-i-p chlorophyll fluorescence rise : Effects of various electron acceptors. *Journal of Photochemistry and Photobiology B-Biology*, 88(1) :43–50, 2007.
- [51] K. K. Karukstis, R. M. Moision, S. K. Johansen, K. E. Birkeland, and S. M. Cohen. Alternative measures of photosystem-II electron-transfer inhibition in anthraquinone-treated chloroplasts. *Photochemistry and Photobiology*, 55(1) :125–132, 1992.
- [52] J. Lavergne. Interaction of exogenous benzoquinone with photosystem-II in chloroplasts - the semi-quinone form acts as a dichlorophenyldimethylurea-insensitive secondary acceptor. *Biochimica et Biophysica Acta*, 679(1) :12–18, 1982.
- [53] V. Petrouleas and B. A. Diner. Light-induced oxidation of the acceptor-side Fe(II) of photosystem-II by exogenous quinones acting through the  $Q_B$  binding-site .1. quinones, kinetics and ph-dependence. *Biochimica et Biophysica Acta*, 893(2) :126–137, 1987.
- [54] N. L. Pshybytko, J. Kruk, L. F. Kabashnikova, and K. Strzalka. Function of plastoquinone in heat stress reactions of plants. *Biochimica Et Biophysica Acta-Bioenergetics*, 1777(11) :1393–1399, 2008.
- [55] S. Rajagopal, E. A. Egorova, N. G. Bukhov, and R. Carpentier. Quenching of excited states of chlorophyll molecules in submembrane fractions of photosystem I by exogenous quinones. *Biochimica Et Biophysica Acta-Bioenergetics*, 1606(1-3) :147–152, 2003.
- [56] D. Shevela and J. Messinger. Probing the turnover efficiency of photosystem II membrane fragments with different electron acceptors. *Biochimica Et Biophysica Acta-Bioenergetics*, 1817(8) :1208–1212, 2012.
- [57] V. Viruvuru and M. Fragata. Photochemical cooperativity in photosystem II. Characterization of oxygen evolution discontinuities in the light-response curves. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 10(44) :6607–6614, 2008.
- [58] D. V. Yanykin, A. A. Khorobrykh, S. A. Khorobrykh, and V. V. Klimov. Photoconsumption of molecular oxygen on both donor and acceptor sides of photosystem

- II in Mn-depleted subchloroplast membrane fragments. *Biochimica Et Biophysica Acta-Bioenergetics*, 1797(4) :516–523, 2010.
- [59] S. G. Yu and L. O. Bjorn. Differences in uv-b sensitivity between PSII from grana lamellae and stroma lamellae. *Journal of Photochemistry and Photobiology B-Biology*, 34(1) :35–38, 1996.
- [60] G. T. Babcock and K. Sauer. Rapid component of electron-paramagnetic resonance signal II - candidate for physiological donor to photosystem-II in spinach-chloroplasts. *Biochimica et Biophysica Acta*, 376(2) :329–344, 1975.
- [61] D. J. Blubaugh, M. Atamian, G. T. Babcock, J. H. Golbeck, and G. M. Cheniae. Photoinhibition of hydroxylamine-extracted photosystem-II membranes - identification of the sites of photodamage. *Biochemistry*, 30(30) :7586–7597, 1991.
- [62] D. F. Ghanotakis, G. T. Babcock, and C. T. Yerkes. Exogenous versus endogenous acceptors in photosystem-II in inhibited chloroplasts. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 225(1) :248–255, 1983.
- [63] H. M. Gleiter, J. H. A. Nugent, E. Haag, and G. Renger. Photoinhibition affects the nonheme iron center in photosystem-II. *Febs Letters*, 313(1) :75–79, 1992.
- [64] W. I. Gruszecki, A. Wardak, and W. Maksymiec. The effect of blue light on electron transport in photosystem II reconstituted in planar bilayer lipid membrane. *Journal of Photochemistry and Photobiology B-Biology*, 39(3) :265–268, 1997.
- [65] V. Vambutas, D. S. Beattie, and G. Moazzami. Anion (and cation) requirements of the coupled electron flow in spinach thylakoids. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, 17(4) :225–237, 1985.
- [66] C. Jegerschoeld, F. MacMillan, W. Lubitz, and A. W. Rutherford. Effects of copper and zinc ions on photosystem II studied by EPR spectroscopy. *Biochemistry*, 38(38) :12439–12445, 1999.
- [67] T. N. Kropacheva, W. O. Feikema, F. Mamedov, Y. Feyziyev, S. Styring, and A. J. Hoff. Spin conversion of cytochrome b(559) in photosystem II induced by exogenous high potential quinone. *Chemical Physics*, 294(3) :471–482, 2003.

- [68] S. A. Khorobrykh, A. A. Khorobrykh, V. V. Klimov, and B. N. Ivanov. Photoconsumption of oxygen in photosystem II preparations under impairment of the water-oxidizing complex. *Biochemistry (Moscow)*, 67(6) :683–688, 2002.
- [69] R. Fromme, R. Hagemann, and G. Renger. *Comparative Studies of Electron Transport and Atrazine Binding in Thylakoids and PS II Particles from Spinach*, chapter 164, pages 783–786. Springer Netherlands, 1987.
- [70] E. Haag, E.J. Boekema, K.D. Irrgang, and G. Renger. *Functional and Structural Characterization of a Highly Oxygen Evolving PS II Core Complex from Spinach*, chapter 82, pages 375–378. Springer Netherlands, 1990.
- [71] S. Itoh. Membrane surface potential and the reactivity of the system II primary electron acceptor to charged electron carriers in the medium. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 504(2) :324–340, 1978.
- [72] B. Bouges-Bocquet. Kinetic models for the electron donors of photosystem II of photosynthesis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Bioenergetics*, 594 :85–103, 1980.
- [73] I. Ikegami and S. Katoh. Studies on chlorophyll fluorescence in chloroplasts .2. effect of ferricyanide on induction of fluorescence in presence of 3-(3,4-dichlorophenyl)-1,1-dimethylurea. *Plant and Cell Physiology*, 14(5) :829–836, 1973.
- [74] V. Petrouleas and B.A. Diner. Identification of Q400, a high-potential electron acceptor of photosystem II, with the iron of the quinone-iron acceptor complex. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 849(2) :264–275, 1986.
- [75] J. L. Zimmermann and A. W. Rutherford. Photoreductant-induced oxidation of  $Fe^{2+}$  in the electron-acceptor complex of photosystem II. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 851(3) :416–423, 1986.
- [76] R. Tel-Vered and I. Willner. Photo-bioelectrochemical cells for energy conversion, sensing, and optoelectronic applications. *ChemElectroChem*, 1(11) :1778–1797, 2014.
- [77] A. Badura, D. Guschin, T. Kothe, M. J. Kopczak, W. Schuhmann, and M. Rogner. Photocurrent generation by photosystem 1 integrated in crosslinked redox hydrogels. *Energy & Environmental Science*, 4(7) :2435–2440, 2011.



- [78] C.J. Faulkner, S. Lees, P.N. Ciesielski, D.E. Cliffel, and G. K. Jennings. Rapid assembly of photosystem I monolayers on gold electrodes. *Langmuir*, 24(16) :8409–8412, 2008.
- [79] D. Gerster, J. Reichert, H. Bi, J.V. Barth, S.M. Kaniber, A.W. Holleitner, I. Visoly-Fisher, S. Sergani, and I. Carmeli. Photocurrent of a single photosynthetic protein. *Nat Nano*, 7(10) :673–676, 2012.
- [80] G. LeBlanc, G. Chen, E.A. Gizzie, G. K. Jennings, and D.E. Cliffel. Enhanced photocurrents of photosystem I films on p-doped silicon. *Advanced Materials*, 24(44) :5959–5962, 2012.
- [81] N. Terasaki, N. Yamamoto, T. Hiraga, Y. Yamanoi, T. Yonezawa, H. Nishihara, T. Ohmori, M. Sakai, M. Fujii, A. Tohri, M. Iwai, Y. Inoue, S. Yoneyama, M. Minakata, and I. Enami. Plugging a molecular wire into photosystem I : Reconstitution of the photoelectric conversion system on a gold electrode. *Angewandte Chemie International Edition*, 48(9) :1585–1587, 2009.
- [82] N. Terasaki, N. Yamamoto, K. Tamada, M. Hattori, T. Hiraga, A. Tohri, I. Sato, M. Iwai, M. Iwai, S. Taguchi, I. Enami, Y. Inoue, Y. Yamanoi, T. Yonezawa, K. Mizuno, M. Murata, H. Nishihara, S. Yoneyama, M. Minakata, T. Ohmori, M. Sakai, and M. Fujii. Bio-photosensor : Cyanobacterial photosystem I coupled with transistor via molecular wire. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1767(6) :653–659, 2007.
- [83] Y. Yamanoi, N. Terasaki, M. Miyachi, Y. Inoue, and H. Nishihara. Enhanced photocurrent production by photosystem I with modified viologen derivatives. *Thin Solid Films*, 520(16) :5123–5127, 2012.
- [84] O. Yehezkeli, R. Tel-Vered, D. Michaeli, R. Nechushtai, and I. Willner. Photosystem I (PSI)/photosystem II (PSII)-based photo-bioelectrochemical cells revealing directional generation of photocurrents. *Small*, 9(17) :2970–2978, 2013.
- [85] O. Yehezkeli, O.I. Wilner, R. Tel-Vered, D. Roizman-Sade, R. Nechushtai, and I. Willner. Generation of photocurrents by bis-aniline-cross-linked Pt nanoparticle/photosystem I composites on electrodes. *The Journal of Physical Chemistry B*, 114(45) :14383–14388, 2010.

- [86] A. Badura, D. Guschin, B. Esper, T. Kothe, S. Neugebauer, W. Schuhmann, and M. Rögner. Photo-induced electron transfer between photosystem 2 via cross-linked redox hydrogels. *Electroanalysis*, 20(10) :1043–1047, 2008.
- [87] J. Maly, J. Masojidek, A. Masci, M. Ilie, E. Cianci, V. Foglietti, W. Vastarella, and R. Pilloton. Direct mediatorless electron transport between the monolayer of photosystem ii and poly(mercapto-p-benzoquinone) modified gold electrode—new design of biosensor for herbicide detection. *Biosensors and Bioelectronics*, 21(6) :923–932, 2005.
- [88] O. Yehezkeli, R. Tel-Vered, J. Wasserman, A. Trifonov, D. Michaeli, R. Nechushtai, and I. Willner. Integrated photosystem II-based photo-bioelectrochemical cells. *Nature Communications*, 3, 2012.
- [89] M. Kato, T. Cardona, A. W. Rutherford, and E. Reisner. Photoelectrochemical water oxidation with photosystem II integrated in a mesoporous indium–tin oxide electrode. *Journal of the American Chemical Society*, 134(20) :8332–8335, 2012.
- [90] J. Maly, J. Krejci, M. Ilie, L. Jakubka, J. Masojídek, R. Pilloton, K. Sameh, P. Stefan, Z. Stryhal, and M. Sugiura. Monolayers of photosystem II on gold electrodes with enhanced sensor response—effect of porosity and protein layer arrangement. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 381(8) :1558–1567, 2005.
- [91] A. Badura, B. Esper, K. Ataka, C. Grunwald, C. Wöll, J. Kuhlmann, J. Heberle, and M. Rögner. Light-driven water splitting for (bio-)hydrogen production : Photosystem 2 as the central part of a bioelectrochemical device. *Photochemistry and Photobiology*, 82(5) :1385–1390, 2006.
- [92] A. Efrati, R. Tel-Vered, D. Michaeli, R. Nechushtai, and I. Willner. Cytochrome c-coupled photosystem I and photosystem II (PSI/PSII) photo-bioelectrochemical cells. *Energy & Environmental Science*, 6(10) :2950–2956, 2013.
- [93] T. Kothe, N. Plumeré, A. Badura, M.M. Nowaczyk, D.A. Guschin, M. Rögner, and W. Schuhmann. Combination of a photosystem 1-based photocathode and a photosystem 2-based photoanode to a z-scheme mimic for biophotovoltaic applications. *Angewandte Chemie International Edition*, 52(52) :14233–14236, 2013.

- [94] K. Hasan, Y. Dilgin, S.C. Emek, M. Tavahodi, H.-E. Akerlund, P.-A. Albertsson, and L. Gorton. Photoelectrochemical communication between thylakoid membranes and gold electrodes through different quinone derivatives. *ChemElectroChem*, 1(1) :131–139, 2014.
- [95] K. Hasan, S.A. Patil, K. Gorecki, D. Leech, C. Hagerhall, and L. Gorton. Electrochemical communication between heterotrophically grown rhodobacter capsulatus with electrodes mediated by an osmium redox polymer. *Bioelectrochemistry*, 93 :30–36, 2013.
- [96] Kamrul Hasan, Sunil A. Patil, Donal Leech, Cecilia Hagerhall, and Lo Gorton. Electrochemical communication between microbial cells and electrodes via osmium redox systems. *Biochemical Society Transactions*, 40 :1330–1335, 2012.
- [97] S.A. Patil, K. Hasan, D. Leech, C. Hagerhall, and Lo Gorton. Improved microbial electrocatalysis with osmium polymer modified electrodes. *Chemical Communications*, 48(82) :10183–10185, 2012.
- [98] J. O. Calkins, Y. Umasankar, H. O’Neill, and R.P. Ramasamy. High photoelectrochemical activity of thylakoid-carbon nanotube composites for photosynthetic energy conversion. *Energy & Environmental Science*, 6(6) :1891–1900, 2013.
- [99] K. Hasan, K.V.R. Reddy, V. Eßmann, K. Górecki, P. Ó Conghaile, W. Schuhmann, D. Leech, C. Hägerhäll, and Lo Gorton. Electrochemical communication between electrodes and rhodobacter capsulatus grown in different metabolic modes. *Electroanalysis*, pages 118–127, 2014.
- [100] M. Kasuno, M. Torimura, Y. Tsukatani, D. Murakami, S. Hanada, T. Matsushita, and H. Tao. Characterization of the photoinduced electron transfer reaction from the photosynthetic system in rhodobacter sphaeroides to an exogenous electron acceptor. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 636 :101–106, 2009.
- [101] M. Torimura, A. Miki, A. Wadano, K. Kano, and T. Ikeda. Electrochemical investigation of cyanobacteria synechococcus sp pcc7942-catalyzed photoreduction of exogenous quinones and photoelectrochemical oxidation of water. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 496(1-2) :21–28, 2001.

- [102] T. Yasukawa, I. Uchida, and T. Matsue. Microamperometric measurements of photosynthetic activity in a single algal protoplast. *Biophysical Journal*, 76(2) :1129–1135, 1999.
- [103] M. Koide, T. Yasukawa, Y. Horiguchi, K. Nagamine, H. Shiku, T. Matsue, and I. Tomoaki. Microfluidic devices for electrochemical measurement of photosynthetic activity of cyanobacteria microsystems cells. *Analytical Sciences*, 28 :69–72, 2012.
- [104] M. Koide, T. Yasukawa, K. Nagamine, H. Shiku, T. Itayama, and T. Matsue. An electrochemical device with microwells for determining the photosynthetic activity of a single cyanobacterium. *Sensors and Actuators B : Chemical*, 153(2) :474–478, 2011.
- [105] P. Bombelli, R.W. Bradley, A.M. Scott, A.J. Philips, A.J. McCormick, S.M. Cruz, A. Anderson, K. Yunus, D.S. Bendall, P.J. Cameron, J.M. Davies, A.G. Smith, C.J. Howe, and A.C. Fisher. Quantitative analysis of the factors limiting solar power transduction by *synechocystis* sp. pcc 6803 in biological photovoltaic devices. *Energy Environ. Sci.*, 4 :4690–4698, 2011.
- [106] D. Huppert, P. M. Rentzepis, and G. Tollin. Picosecond kinetics of chlorophyll and chlorophyll-quinone solutions in ethanol. *Biochimica et Biophysica Acta*, 440(2) :356–364, 1976.
- [107] G. R. Seely. Energetics of electron-transfer reactions of chlorophyll and other compounds. *Photochemistry and Photobiology*, 27(5) :639–654, 1978.
- [108] G. Longatte, H.-Y. Fu, O. Buriez, E. Labbé, F.-A. Wollman, C. Amatore, F. Rappaport, M. Guille-Collignon, and F. Lemaître. Evaluation of photosynthetic electrons derivation by exogenous redox mediators. *Biophysical Chemistry*, 205(0) :1 – 8, 2015.
- [109] L. Houille-Vernes, F. Rappaport, F.-A. Wollman, J. Alric, and X. Johnson. Plastid terminal oxidase 2 (PTOX2) is the major oxidase involved in chlororespiration in *chlamydomonas*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(51) :20820–20825, 2011.
- [110] F. Rappaport and B.A. Diner. Primary photochemistry and energetics leading to the oxidation of the (mn)<sub>4</sub>ca cluster and to the evolution of molecular oxygen in

- photosystem {II}. *Coordination Chemistry Reviews*, 252 :259 – 272, 2008. The Role of Manganese in Photosystem {II}.
- [111] B. Genty, J.-M. Briantais, and Baker N.R. The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron transport and quenching of chlorophyll fluorescence. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 990(1) :87 – 92, 1989.
- [112] K.K. Karukstis, S.C. Boegeman, J. A. Fruetel, Gruber S.M., and Terris M.H. Multivariate analysis of photosystem {II} fluorescence quenching by substituted benzoquinones and naphthoquinones. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 891(3) :256 – 264, 1987.
- [113] Kerry K. Karukstis, Suzanne M. Gruber, Julia A. Fruetel, and S.Christopher Boegeman. Quenching of chlorophyll fluorescence by substituted anthraquinones. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 932(0) :84 – 90, 1988.
- [114] J. Balintova, R. Pohl, P. Horakova, P. Vidlakova, L. Havran, M. Fojta, and M. Hockek. Anthraquinone as a redox label for dna : Synthesis, enzymatic incorporation, and electrochemistry of anthraquinone-modified nucleosides, nucleotides, and dna. *Chemistry-a European Journal*, 17(50) :14063–14073, 2011.
- [115] C. Batchelor-McAuley, Q. Li, S. M. Dapin, and R. G. Compton. Voltammetric characterization of dna intercalators across the full pH range : Anthraquinone-2,6-disulfonate and anthraquinone-2-sulfonate. *Journal of Physical Chemistry B*, 114(11) :4094–4100, 2010.
- [116] C. Batchelor-McAuley, G.G. Wildgoose, and R.G. Compton. The physicochemical aspects of DNA sensing using electrochemical methods. *Biosensors and Bioelectronics*, 24(11) :3183–3190, 2009.
- [117] E. E. Ferapontova. Electrochemical indicators for DNA electroanalysis. *Current Analytical Chemistry*, 7(1) :51–62, 2011.
- [118] G. March, V. Noël, B. Piro, S. Reisberg, and M.-C. Pham. Nanometric layers for direct, signal-on, selective, and sensitive electrochemical detection of oligonucleotides hybridization. *Journal of the American Chemical Society*, 130(47) :15752–15753, 2008.

- [119] S. Reisberg, B. Piro, V. Noel, T. D. Nguyen, P. E. Nielsen, and M. C. Pham. Investigation of the charge effect on the electrochemical transduction in a quinone-based DNA sensor. *Electrochimica Acta*, 54(2) :346–351, 2008.
- [120] E. L. S. Wong and J. J. Gooding. Electronic detection of target nucleic acids by a 2,6-disulfonic acid anthraquinone intercalator. *Analytical Chemistry*, 75(15) :3845–3852, 2003.
- [121] B. Zhang, Q. Piro, S. Ramsay, V. Noël, S. Reisberg, and M.-C. Pham. Electrochemical investigation of interactions between quinone derivatives and single stranded dna. *Electrochimica Acta*, 85(0) :588–593, 2012.
- [122] Q.D. Zhang, B. Piro, V. Noël, S. Reisberg, and M.-C. Pham. Functionalization of single-walled carbon nanotubes for direct and selective electrochemical detection of dna. *Analyst*, 136(5) :1023–1028, 2011.
- [123] T. Bechtold, C. Fitz-Binder, and A. Turcanu. Electrochemical characteristics and dyeing properties of selected 9,10-anthraquinones as mediators for the indirect cathodic reduction of dyes. *Dyes and Pigments*, 87(3) :194–203, 2010.
- [124] V. A. Shapovalov. Kinetics and thermodynamics of the mediator function of 9,10-anthraquinone derivatives in electrochemical reactions with peroxidase. *Russian Journal of General Chemistry*, 74(3) :368–370, 2004.
- [125] A. Turcanu, C. Fitz-Binder, and T. Bechtold. Indirect cathodic reduction of dispersed ci vat blue 1 (indigo) by dihydroxy-9,10-anthraquinones in cyclic voltammetry experiments. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 654(1-2) :29–37, 2011.
- [126] J.Q. Chambers. Electrochemistry of quinones. In *The Chemistry of Quinonoid Compounds*. Wiley, 1974.
- [127] E. Laviron. Electrochemical reactions with protonations at equilibrium : Part xiii. experimental study of the homogeneous electron exchange in quinone/dihydroquinone systems. *Journal of Electroanalytical Chemistry and Interfacial Electrochemistry*, 208(2) :357–372, 1986.
- [128] E. Laviron. Electrochemical reactions with protonations at equilibrium : Part x. the kinetics of the p-benzoquinone/hydroquinone couple on a platinum electrode. *Jour-*

- nal of Electroanalytical Chemistry and Interfacial Electrochemistry*, 164(2) :213–227, 1984.
- [129] E. Laviron. Electrochemical reactions with protonations at equilibrium : Part xii. the  $2 e^-$ ,  $2 h^+$  homogeneous isotopic electron exchange reaction (nine-member square scheme). *Journal of Electroanalytical Chemistry and Interfacial Electrochemistry*, 169 :29–46, 1984.
- [130] E. Laviron. Electrochemical reactions with protonations at equilibrium : Part vii. the  $2 e^-$ ,  $1 h^+$  reaction (six-member fence scheme) for a surface or for a heterogeneous reaction in the absence of disproportionation or dimerization. *Journal of Electroanalytical Chemistry and Interfacial Electrochemistry*, 146(1) :1–13, 1983.
- [131] E. Laviron. Electrochemical reactions with protonations at equilibrium : Part viii. the  $2 e^-$ ,  $2 h^+$  reaction (nine-member square scheme) for a surface or for a heterogeneous reaction in the absence of disproportionation and dimerization reactions. *Journal of Electroanalytical Chemistry and Interfacial Electrochemistry*, 146(1) :15–36, 1983.
- [132] E. Laviron. Electrochemical reactions with protonations at equilibrium .2. the  $1 e^-$ ,  $1 h^+$  reaction (4-member square scheme) for a heterogeneous reaction. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 124(1-2) :1–7, 1981.
- [133] E. Laviron. Electrochemical reactions with protonations at equilibrium : Part iii. the  $1 e^-$ ,  $2 h^+$  reaction (six-member ladder scheme) for a surface or for a heterogeneous reaction. *Journal of Electroanalytical Chemistry and Interfacial Electrochemistry*, 124 :9–17, 1981.
- [134] E. Laviron. Electrochemical reactions with protonations at equilibrium : Part iv. general considerations on the reaction sequence. *Journal of Electroanalytical Chemistry and Interfacial Electrochemistry*, 130 :23–29, 1981.
- [135] C. Costentin, D.H. Evans, R. Marc, J.-M. Savéant, and P S. Singh. Electrochemical approach to concerted proton and electron transfers. reduction of the water-superoxide ion complex. *Journal of the American Chemical Society*, 127(36) :12490–12491, 2005.

- [136] A. J. S. Ahammad, S. Sarker, M.A. Rahman, and J.-J. Lee. Simultaneous determination of hydroquinone and catechol at an activated glassy carbon electrode. *Electroanalysis*, 22(6) :694–700, 2010.
- [137] C. Amatore, M. Azzabi, P. Calas, A. Jutand, C. Lefrou, and Y. Rollin. Absolute determination of electron consumption in transient or steady state electrochemical techniques. *Journal of Electroanalytical Chemistry and Interfacial Electrochemistry*, 288 :45–63, 1990.
- [138] B. Rimbault, D. Esposito, D. Drapier, Y. Choquet, D. Stern, and F.-A. Wollman. Identification of the initiation codon for the atpb gene in chlamydomonas chloroplasts excludes translation of a precursor form of the  $\hat{\text{I}}^2$  subunit of the atp synthase. *Molecular and General Genetics MGG*, 264(4) :486–491, 2000.
- [139] Inc. Wolfram Research. *Mathematica*. Wolfram Research, Inc., Champaign, Illinois, version 9.0 edition, 2012.



# Table des figures

1.1	Schéma de la structure d'un chloroplaste, (1) membrane externe et (3) interne, (2) espace intermembranaire, (4) stroma, (5) lumen, (6) membrane du thylakoïde, (7) granum, (8) thylakoïde, (9) amidon, (10) ribosome, (11) ADN chloroplastique, (12) gouttellette lipidique [1]. . . . .	17
1.2	Schéma en coupe d'une membrane thylakoïde [2]. . . . .	18
1.3	Schéma de la chaîne photosynthétique pour des phototrophes oxygéniques [3].	19
1.4	Représentation du cycle de Kok : oxydation catalytique de l'eau et réduction du photosystème II [4]. . . . .	20
1.5	Schéma récapitulant les différentes étapes de transferts d'électrons le long de la chaîne photosynthétique, avec le temps caractéristique de chaque étape et le potentiel de demi-vague des couples rédox mis en jeu par rapport à l'ENH [7]. . . . .	22
1.6	Schéma du transfert d'électrons du PSII au PSI, passant par un cycle Q au niveau du cytochrome $b_6f$ [5]. . . . .	23
1.7	Schéma récapitulant l'activité antiphotoinhibition du site donneur par le DCMU sur des membranes thylakoïdes sans chlorures selon Jegerschöld et al [22]. . . . .	25
1.8	Fluorescence en fonction du temps suite à l'application de différentes lumières sur des photosystèmes II en suspension, ML lumière de détection, AL lumière actinique (qui provoque la réduction des accepteurs d'électrons du photosystème II et PIL lumière provoquant la photoinhibition) en conditions anaérobiques (trait continu) et aérobiques (pointillés), FeCy représentant un ajout de 70 $\mu M$ de ferricyanure [27]. . . . .	26

1.9	Etude de photoinhibition en conditions anaérobiques : (A) Evolution au cours du temps de $F_{max}$ (losanges), de $F_0$ (croix) et de ses différentes contributions : rapide (ronds), semistable (carrés) ainsi que stable et non décroissante (triangles), (B) dépendance de ces mêmes contributions en fonction du pH après 10 minutes de photoinhibition [27]. . . . .	27
1.10	Schéma récapitulant le mécanisme de photoinhibition du site accepteur [27].	29
1.11	Schéma récapitulatif du turn-over de la protéine D1 [33]. . . . .	30
1.12	Schéma récapitulant les conditions de l'existence d'une photoinhibition à l'échelle macroscopique [17]. . . . .	31
1.13	Schéma de principe de l'insertion de nanoélectrodes dans le chloroplaste de <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> , en travaillant sur cellules vivantes [35]. . . . .	33
1.14	Courant en fonction du temps, au cours de périodes d'illumination et d'obscurité, à l'extérieur de la cellule à gauche, à l'intérieur de la cellule à droite, selon Ryu et al [35], l'électrode d'or (de diamètre inférieur à 30 nm) étant portée à un potentiel de 200 mV par rapport à une électrode de référence flottante en or. . . . .	33
1.15	Schéma d'une surface d'électrode modifiée par des thylakoïdes isolés [36]. .	34
1.16	Densités de photocourants obtenus avec cette approche à 0,3V/ECS, les flèches grises indiquant le début des irradiations, les flèches noires la fin des irradiations [36]. . . . .	35
1.17	Exemple de courbes de puissance obtenue sur la base d'un biofilm constitué de <i>Synechococcus</i> sp. WH 5701 sur ITO [40]. . . . .	36
1.18	Schéma de principe d'une surface sur laquelle des centres PSII sont immobilisés au sein d'un polymère conducteur modifié par des complexes d'osmium servant d'accepteur électronique. [86] . . . . .	42
1.19	Densité de courant en fonction du temps suite à une illumination du système à une longueur d'onde de 675 nm, à $2,65 \text{ mW.cm}^{-2}$ , le potentiel appliqué étant de 300 mV/Ag/AgCl [86], sur une électrode d'or de 2 mm de diamètre. . . . .	43

1.20	Densité de courant en fonction du temps, au fil de pulses successifs de lumière à 100 $\mu\text{mol}$ de $photons.m^{-2}.s^{-1}$ , de longueur d'onde 675 nm, à une concentration de 2,6-DCBQ de 1 mM, et à un potentiel de 0,3 V/Ag/AgCl [91]. . . . .	43
1.21	Schéma d'une électrode d'ITO modifiée par des centres PSI et PSII au sein d'une matrice de polymère conducteurs. [84] . . . . .	44
1.22	Schéma de principe d'une biopile constituée de centres PSI et PSII respectivement à la cathode et à l'anode au sein de polymères d'osmium [93]. . .	45
1.23	Schéma de l'utilisation de centres PSII comme ponts entre l'anode et la cathode dans le cadre d'une biopile [88]. . . . .	45
1.24	Courbe de polarisation ( $E=f(J)$ ) à gauche et dépendance de la densité de puissance émise en fonction de la densité de courant émis (à droite) par une biopile de type poly(mercapto-p-benzoquinone)/PSII/bilirubin oxydase/ nanotubes de carbones/carbone[83], Puissance incidente de 0,1 W, longueur d'onde supérieure à 400 nm [88]. . . . .	46
1.25	Schéma de l'approche d' un transfert d'électrons médié entre une membrane thylakoïde adsorbée et une électrode modifiée par des nanoparticules d'or [94].	47
1.26	Courant en fonction du temps au cours de deux pulses successifs de lumière à une intensité lumineuse de 680 $mW.cm^{-2}$ , à un potentiel de 400 mV/Ag/AgCl pour différentes concentrations de benzoquinone, avec une électrode d'une surface géométrique de 0,02 $cm^2$ [94]. . . . .	47
1.27	Tableau récapitulant les densités de courant maximale mesurées à 400 mV/Ag/AgCl, concentration de quinone égale à 600 $\mu\text{M}$ , intensité lumineuse de 680 $W.cm^{-2}$ selon Gorton et al [94]. . . . .	48
1.28	Densités de photocourants obtenus sur une électrode d'or modifiée par des nanotubes de carbone et des membranes thylakoïdes en présence $Fe(CN)_6^{3-/4-}$ 1,5 mM, l'électrode (de 0,02 $cm^2$ ) étant portée à un potentiel de 0,2 V vs Ag/AgCl [98]. . . . .	49

1.29	Schéma de l'extraction de photocourants de Rhodobacter Capsulatus décrite par Gorton et al, les cercles rouges représentant les polymères d'Osmium, et les traits rouges pointillés des transferts d'électrons envisageables [99]. . . . .	50
1.30	Mesure de photocourants réalisés en déposant Rhodobacter capsulatus sur une électrode de carbone nue (3,05 mm) (A), modifiée par le polymère d'osmium Os-BPPVI (B) ou sur la même électrode de carbone modifiée en présence de benzoquinone (0,6 mM)(C) [99]. . . . .	51
1.31	Photocourants obtenus suite à l'exposition de Synechococcus à 100 mM de BQ dans une solution de pH 8, sous illumination à $150 \mu\text{mol.s}^{-1}.\text{m}^{-2}$ en présence d'une électrode tournante de carbone portée à 0,6 V/Ag/AgCl [101](gauche), ou de Rhodobacter Sphaeroides exposés à 100 mM de dichlorobenzoquinone en milieu tampon pH 8, la vitesse de rotation de l'électrode est de 1500 rpm et le flux de photons est de $1000 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ [100]. (à droite) . . . . .	52
1.32	Courant d'oxydation de la benzoquinone en fonction du temps enregistré sur une électrode disque d'or (10 $\mu\text{m}$ de rayon) placée à environ 1 $\mu\text{m}$ de la membrane du protoplasme. L'électrode est portée à un potentiel de 0,5V/Ag/AgCl, en absence (a) et en présence (b) de 5 $\mu\text{M}$ de DCMU, la concentration en benzoquinone étant de 1 mM et l'intensité lumineuse de 18 Klux. [102] . . . . .	54
1.33	Structure des différentes quinones envisagées dans la suite de ce manuscrit.	55
2.1	Schéma des principales voies d'excitation et de désexcitation du photosystème II. . . . .	58
2.2	Energie en fonction de la distance entre la chlorophylle D et l'accepteur A, dans le cas où les deux molécules sont dans leur état fondamental (D+A), dans le cas où la chlorophylle est excitée (D*+A) ou dans le cas de la paire d'ions (D <sup>+</sup> A <sup>-</sup> ) [107]. . . . .	59

2.3	Schéma des principales voies d'excitation et de désexcitation du photosystème II incluant le quenching, avec Q un quencheur de fluorescence tel qu'une quinone. . . . .	59
2.4	Schéma de principe du dispositif expérimental de mesure de fluorescence utilisé. . . . .	60
2.5	Allure des résultats expérimentaux, en noir en absence de quinone, en rouge en présence de quinone sur une suspension du mutant $\Delta PetA$ (sans $b_6f$ ) de l'algue unicellulaire <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> à une concentration d'environ $10^7$ cellules par mL, à $340 \mu E.m^{-2}.s^{-1}$ . . . . .	62
2.6	Allure des résultats expérimentaux, en noir en absence de quinone, en rouge en présence de quinone sur une suspension du mutant $\Delta PetA$ (sans $b_6f$ ) de l'algue unicellulaire <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> à une concentration d'environ $10^7$ cellules par mL, à $135 \mu E.m^{-2}.s^{-1}$ . . . . .	62
2.7	Schéma de l'expérience réalisée, notion de centres ouverts et centres fermés	64
2.8	Dérivation électronique (paramètre $D_Q$ ) en fonction de la concentration introduite en 2,6-DCBQ en $\mu mol.L^{-1}$ , sur une suspension de mutant $\Delta PetA$ de l'algue unicellulaire <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> ( $10^7$ cellules par mL) .	66
2.9	Quenching (Q) en fonction de la concentration introduite en 2,6-DCBQ en $\mu mol.L^{-1}$ , sur une suspension de mutant $\Delta PetA$ de l'algue unicellulaire <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> ( $10^7$ cellules par mL), simulations linéaires à paramètres ajustés numériquement sur toute la gamme de concentration (ligne rouge, $r^2=0,96$ , $Q=1,25.10^4xC$ ), sur deux gammes de concentration (ligne noire $r^2=0,84$ $Q=449xC$ aux faibles concentrations et $r^2=0,99$ $Q=1,7910^4xC-0,14332$ aux fortes concentrations) . . . . .	67
2.10	Dérivation électronique (paramètre $D_Q$ ) en fonction de la concentration en 2,6-DCBQ en $\mu mol.L^{-1}$ introduite ( $C_{tot}$ , en rouge) et accessible au quenching ( $C_Q$ , en noir), sur une suspension de mutant $\Delta PetA$ de l'algue unicellulaire <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> ( $10^7$ cellules par mL environ). . . . .	70

2.11	Dérivation électronique (paramètre $D_Q$ ) en fonction de la concentration en 2,6-DCBQ en $\mu\text{mol.L}^{-1}$ accessible au quenching ( $C_Q$ ) sur une suspension de mutant $\Delta\text{PetA}$ de l'algue unicellulaire <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> ( $10^7$ cellules par mL environ), modélisation par une équation de type Michaélis-Menten ( $r^2=0,99$ ).	70
2.12	Dérivation électronique (paramètre $D_Q$ ) en fonction de la concentration en 2,6-DMBQ en $\mu\text{mol.L}^{-1}$ accessible au quenching ( $C_Q$ ) sur une suspension de mutant $\Delta\text{PetA}$ de l'algue unicellulaire <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> ( $10^7$ cellules par mL environ), flux de photons incident de $340 \mu\text{E.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ modélisation par une équation de type Michaélis-Menten.	72
2.13	Schéma d'une membrane thylakoïde représentant les différentes grandeurs géométriques considérées dans l'estimation du temps de séjour de la forme hydroquinone dans la membrane.	73
2.14	Mécanisme proposé de la dérivation électronique	75
2.15	Diagramme 3D représentant la proportion de sites ouverts en fonction de $\text{Log}(\alpha)$ et de $\text{Log}(\beta)$	78
2.16	Diagramme de zones résumant les différents domaines. La ligne jaune représente la transition entre la zone inverse et la zone normale. La ligne pointillée orange est la condition pour laquelle les flux endogène et exogène sont identiques, les lignes continues orange représentant les transitions à partir desquelles l'un des deux flux peut être négligé (à 10% près). La ligne pointillée rouge représente la condition pour laquelle le flux exogène est limité par l'arrivée de la quinone au site et par le transfert d'électron à égalité. Les lignes continues rouges représentent les domaines dans lesquels l'un des deux phénomènes peut être négligé. Les couleurs de fond permettent une estimation de la valeur de $\phi/\phi_0$ .	79
2.17	Inverse de la proportion de sites ouverts en absence de quinones sur une suspension de mutants fl de <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> en fonction du flux de photons incident, modélisation par une fonction affine ( $1+0,10636I$ , $r^2 = 0,995$ (point à $1500 \mu\text{E.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ non pris en compte).	83

2.18	Evolution de la proportion de sites ouverts en fonction de la concentration en 2,6-DCBQ en $\mu\text{mol/L}$ pour des flux de photons incidents (en $\mu\text{E.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ ) de 56 (orange), 135 (vert), 340 (bleu), 800 (rouge) et 1500 (noir). . . . .	83
2.19	Evolution de l'inverse de $D_{\infty}$ en fonction du flux de photons incident en $\mu\text{E.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ , modèle linéaire à paramètre ajusté numériquement ( $1+0,00106I$ , $r^2=0,996$ ). . . . .	85
2.20	Evolution de l'inverse de $D_{\infty}$ en fonction de l'inverse de $\phi_0$ , modélisation linéaire correspondante. . . . .	86
2.21	Evolution de l'inverse de $\rho_0$ en fonction de l'inverse de $\phi_0$ , modélisation linéaire correspondante ( $1/\rho_0 = 3,75205 * 10^{-7}/\phi_0$ , $r^2 = 0,987$ ). . . . .	87
2.22	Evolution de la proportion de sites ouverts par le flux endogène en fonction de la concentration en quinone à différentes intensités lumineuses en $\mu\text{E.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ : 56 (orange), 135 (vert), 340 (bleu), 800 (rouge), 1500 (noir). . . . .	87
2.23	Evolution de la proportion de sites ouverts par le flux exogène en fonction de la concentration en quinone à différentes intensités lumineuses en $\mu\text{E.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ : 56 (orange), 135 (vert), 340 (bleu), 800 (rouge), 1500 (noir). . . . .	88
2.24	Graphique 3D représentant l'évolution de la proportion de sites ouverts en fonction de la concentration en quinones et de l'intensité lumineuse, sur une suspension de mutants fl de <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> à $10^7$ cellules par mL. . . . .	89
2.25	Diagramme de zones dans le cas d'une suspension de mutants fl de <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> en fonction des logarithmes des concentrations et intensités lumineuses, la couleur représentant la proportion de sites ouverts . . . . .	89
2.26	Allure de la fluorescence en fonction du temps lors de l'irradiation d'un sauvage de <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> avec un flux de photons incidents de $800 \mu\text{E.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ en absence de quinones (courbe noire) et en présence de 2,6-DCBQ (courbe rouge) . . . . .	91
2.27	Evolution de l'inverse de $\phi_0$ en fonction du flux de photon incident, modélisation par une fonction affine ( $1+0,00364I$ , $r^2$ de 0,99) . . . . .	92

2.28	$\phi$ en fonction de la concentration en 2,6-DCBQ à différents flux de photons incidents 1500 (noir), 800 (rouge) et 340 (bleu) $\mu E.m^{-2}.s^{-1}$ (points), ajustements du modèle correspondant (lignes continues, les couleurs correspondant).	93
2.29	Evolution de l'inverse de $D_{\infty}$ en fonction du flux de photon incident en $E.m^{-2}.s^{-1}$ , simulation linéaire correspondante ( $1+0,00116I$ , $r^2 = 0,999$ ).	94
2.30	Evolution de l'inverse de $\rho_0$ en fonction de la proportion de sites ouverts en absence de quinones, simulation linéaire correspondante (pente $2,89 * 10^{-6}$ , $r^2 = 0,999$ ).	95
2.31	Proportion de sites ouverts par le flux endogène en fonction de la concentration en 2,6-DCBQ, à des flux de photons incidents (en $\mu E.m^2.s^{-1}$ ) de : 340 (bleu), 800 (rouge), 1500 (noir).	95
2.32	Proportion de sites ouverts par le flux exogène en fonction de la concentration en 2,6-DCBQ, à des flux de photons incidents (en $\mu E.m^2.s^{-1}$ ) de : 340 (bleu), 800 (rouge), 1500 (noir).	96
2.33	Graphique 3D représentant l'évolution de la proportion de sites ouverts en fonction de la concentration en quinones et de l'intensité lumineuse, sur une suspension de sauvages de <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> à $10^7$ cellules par mL.	96
2.34	Diagramme de zones dans le cas d'une suspension de mutants sauvages de <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> en fonction des logarithmes des concentrations et intensités lumineuses, la couleur représentant la proportion de sites ouverts.	97
2.35	Allure de la fonction ProductLog	99
2.36	Proportion de quinones sous leur forme oxydée en fonction du temps et de la concentration en quinone normalisée.	100
2.37	Evolution de $-\ln((1/D_{\infty}) - 1)$ en fonction de la différence de potentiel de demi-vague entre la quinone exogène et l'accepteur d'électron $Q_A$ , modélisation par une loi linéaire ( $r^2 = 0,9993$ ).	102
3.1	Schéma de la structure de type benzoquinone (Q, à gauche) et hydroquinone ( $QH_2$ ) à droite	105



3.2	Représentation générale d'un schéma à 4 dans le cas du transfert d'un électron et d'un proton, avec $kh_2$ et $kh_1$ des constantes de vitesse de transferts d'électron interfaciaux, $E_2$ et $E_1$ les potentiels standards associés, $K_1$ et $K_2$ des constantes d'équilibre de réaction en phase homogène notables $K_a$ dans le cas de réactions acido-basiques [132]. . . . .	107
3.3	Diagramme potentiel pH pour un schéma carré à 4 avec $pKa_1 = 2$ et $pKa_2 = 12$ [134]. . . . .	107
3.4	Diagramme de prédominance des différentes séquences en fonction du pH, dans le cas où les constantes de vitesses de transfert d'électron sont égales [134]. . . . .	108
3.5	Schéma en échelle, représentation générale à gauche (1 électron, deux étapes chimiques non précisées), application au cas du transfert d'1 électron et de deux protons à droite [130]. . . . .	109
3.6	Diagramme de Pourbaix théoriques obtenus dans le cadre d'un schéma en échelle (transfert d'un électron et de deux protons), à gauche cas où $pKa_2 < pKa_3$ , à droite cas où $pKa_3 < pKa_2$ [130]. . . . .	109
3.7	Diagrammes de prédominance des différentes séquences réactionnelles envisageables en fonction du pH, le bilan majoritaire de la réaction étant précisé en haut du graphe pour chaque tranche de pH, et la nature du transfert d'électron occasionné numéroté [130]. . . . .	111
3.8	Représentation générale d'un schéma carré à 9 espèces à gauche, application au cas du transfert de deux électrons et de deux protons [131]. . . . .	111
3.9	Exemple de diagramme de prédominance dans le cadre d'un schéma carré à 9 espèces, cas dans lequel $E_2 - E_5 = 1,4V > 2.3RT/F(pKa_5 - pKa_3)$ , les valeurs de pKa étant représentées sur la figure [131]. . . . .	112
3.10	Diagramme potentiel pH d'un schéma à 9 avec des constantes identiques à celles de la figure précédente, sauf $E_2 - E_5 = 0,8V < 2.3RT/F(pKa_5 - pKa_3)$ [131]. . . . .	113
3.11	Autre exemple de diagramme de prédominance dans le cadre d'un schéma carré à 9 espèces, cas dans lequel $E_2 - E_5 = 1,4V > 2,3RT/F(pKa_5 - pKa_3)$ , les nouvelles valeurs de pKa étant représentées sur la figure. [131] . . . . .	113

3.12 Exemple de diagramme de prédominance de différentes séquences réactionnelles en fonction du pH [131] . . . . .	114
3.13 Voltammogramme de l'hydroquinone à 5 mM dans du PBS pH 7,4, électrode de carbone vitreux de rayon 3 mm, vitesse de balayage 50 mV/s. . . . .	116
3.14 Courant de pic en fonction de la racine carrée de la vitesse de balayage, électrode de carbone vitreux de rayon 3 mm, hydroquinone 5 mM. . . . .	116
3.15 Voltammogrammes de l'hydroquinone et de la benzoquinone à une concentration de 5 mM, électrode de carbone vitreux de 3 mm vitesse de balayage de 50 mV/s, PBS pH 7,4. . . . .	117
3.16 Schéma carré à 9 espèces dans le cas d'un échange de 2 électrons et de 2 protons [131]. . . . .	118
3.17 Voltammogrammes de l'hydroquinone (rouge) et de la benzoquinone (noir) à une concentration de 0,5 mM, électrode de carbone vitreux de 1 mm, PBS pH 7, vitesse de balayage de 50 mV/s. . . . .	119
3.18 Voltammogrammes de la 2,6-DCBQ (à gauche) et de la 2,5-DCBQ (à droite) à une concentration de 0,5 mM dans le PBS, à une vitesse de balayage de 100 mV/s sur une électrode de carbone de 3 mm de rayon . . . . .	120
3.19 Voltammogrammes de la 2,6-DMBQ (à gauche) et de la 2,5-DMBQ (à droite) à une concentration de 1 mM dans le PBS, à une vitesse de balayage de 100 mV/s sur une électrode de carbone de 3 mm de rayon. . . . .	120
3.20 Voltammogrammes de la PPBQ (à gauche) et de la NBQ (à droite) à une concentration de 0,5 mM dans le PBS, à une vitesse de balayage de 100 mV/s sur une électrode de carbone de 3 mm de rayon . . . . .	121
3.21 Voltammogramme de l'hydroquinone 0,5 mM en milieu PBS sur une électrode de carbone vitreux (3 mm de diamètre) nue (iii) et pré-traitée (iv), blanc (PBS) sur électrode nue (i) et prétraitée (ii) [136] . . . . .	122
3.22 Courant en fonction du temps sur une électrode de 3 mm de rayon, potentiel de 1,7V/ECS pendant 400 s, procédure détaillée par Ahammad et al [136].	124
3.23 Voltammogrammes à 100 mV/s de l'hydroquinone (5 mM) sur une électrode de carbone vitreux de 3 mm de rayon nue (en rouge) et polarisée (en noire) selon la méthode décrite par Ahammad et al [136]. . . . .	124

3.24	Voltammogrammes des DMBQ (2,6-DMBQ à gauche et 2,5-DMBQ à droite), à une concentration de 1 mM, vitesse de balayage de $100mV/s$ , sur une électrode de carbone de 3 mm de rayon nue (en rouge), prétraitée (en noir) selon la procédure détaillée par Ahammad et al [136]. . . . .	125
3.25	Voltammogrammes de la Phenyl-para-Benzoquinone (PPBQ, à gauche) et de la Naphtobenzoquinone (NBQ, à droite), à une concentration de 0,5 mM, vitesse de balayage de $100 mV/s$ , sur une électrode de carbone de 3 mm de rayon nue en rouge, prétraitée en noir selon la procédure détaillée par Ahammad et al [136]. . . . .	125
3.26	Voltammogrammes des DCBQ (2,6-DCBQ à gauche et 2,5-DCBQ à droite), à une concentration de 1 mM, vitesse de balayage de $100mV/s$ , sur une électrode de carbone de 3 mm de rayon nue (en rouge), prétraitée (en noir) selon la procédure détaillée par Ahammad et al [136]. . . . .	126
3.27	Courant mesuré à la fin d'une chronoampérométrie en fonction de la durée du saut potentiostatique, électrode de carbone vitreux 2 mm, concentration de 0,5 mM, modélisations par des lois de Cottrell (cas de la réduction de la benzoquinone, $i=14,3.t^{-1/2}$ , $r^2 = 0,995$ , cas de l'oxydation du ferrocène $i=7,03.t^{-1/2}$ , $r^2 = 0,996$ ). . . . .	129
3.28	Courant limite de voltammogrammes enregistrés sur une électrode tournante en fonction de sa vitesse de rotation, modélisations par des équations de Lévisch (cas de la réduction de la benzoquinone $i=1,33\omega^{0,5}r^2 = 0,95$ , cas de l'oxydation du ferrocène $i=0,59\omega^{0,5}r^2 = 0,992$ . . . . .	130

4.1	Evolution du $\log(o)$ (couleurs) en fonction de $\log(k)$ et de $\log(b)$ , la ligne orange discontinue correspondant aux conditions dans lesquelles le flux électronique est limité à parts égales entre l'arrivée de la quinone à la poche $Q_B$ et la vitesse de transfert d'électrons. Les lignes oranges continues délimitant les domaines dans lesquels sont cinétiquement limitants le transfert d'électrons (ligne du bas) et l'arrivée de la quinone (ligne du haut) à 10 % près. Les lignes rouges sont des lignes d'iso valeurs de $(o)$ définissant le rapport entre la limitation du courant par la régénération électrochimique et par la dérivation électronique (limitation par la dérivation électronique à droite et par la régénération électrochimique à gauche). La zone notée 2 est indiquée par la flèche noire et nécessite que la ligne rouge la plus basse soit au dessus de la ligne orange la plus haute. . . . .	135
4.2	Evolution du $\log(\psi)$ (couleurs) en fonction de $\log(k)$ et de $\log(b)$ . Les lignes ont la même signification qu'en figure 4.1. . . . .	137
4.3	Evolution de la proportion de sites ouverts en fonction de $\tau$ et de $b$ pour une valeur de $k$ égale à 6. . . . .	141
4.4	Evolution du courant adimensionné $\psi$ en fonction de $\tau$ et de $b$ pour une valeur de $k$ égale à 6. . . . .	141
4.5	Evolution de la proportion de sites ouverts en fonction de $\tau$ et de $b$ pour un $k$ de 0,04. . . . .	142
4.6	Evolution du courant adimensionné $\psi$ en fonction de $\tau$ et de $b$ pour une valeur de $k$ de 0,04. . . . .	142
4.7	Evolution de la proportion de sites ouverts en fonction de $\tau$ et de $b$ pour une valeur de $k$ de 0,4. . . . .	143
4.8	Evolution du courant adimensionné $\psi$ en fonction de $\tau$ et de $b$ pour une valeur de $k$ de 0,4. . . . .	143

- 4.9 Courant en fonction du temps à un potentiel de travail de 650 mV/AgAgCl sur une suspension de mutants PetA ( $\Delta b_6f$ ) à une concentration de l'ordre de  $10^7$  cellules par mL au fil d'un cycle jour/nuit (flux lumineux incident de  $340 \mu\text{E.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ ) pour une concentration en 2,6-DCBQ de 100  $\mu\text{M}$ , en noir est représenté le courant mesuré, en rouge une modélisation de la ligne de base et en bleu le photocourant obtenu. . . . . 145
- 4.10 Courant en fonction du temps à un potentiel de travail de 650 mV/AgAgCl après soustraction de la ligne de base sur une suspension de mutants PetA ( $\Delta b_6f$ ) à une concentration de l'ordre de  $10^7$  cellules par mL au fil d'un cycle jour/nuit pour une concentration en 2,6-DCBQ de 40  $\mu\text{M}$  (en bleu) et de 100  $\mu\text{M}$  (en noir) à un flux de photons incident de  $340 \mu\text{E.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ . . 146
- 4.11 Courant en fonction du temps à un potentiel de travail de 650 mV/AgAgCl sur une suspension de mutants PetA ( $\Delta b_6f$ ) à une concentration de l'ordre de  $10^7$  cellules par mL au fil d'un cycle jour/nuit après soustraction de la ligne de base obtenu à un flux de photons incident plus faible ( $135 \mu\text{E.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ ) pour une concentration en 2,6-DCBQ de 100  $\mu\text{M}$  (noir), 75  $\mu\text{M}$  (rouge) et 40  $\mu\text{M}$  (bleu). . . . . 147
- 4.12 Courant en fonction du temps à un potentiel de travail de 650 mV/AgAgCl après soustraction de la ligne de base sur une suspension de *Chlamydomonas reinhardtii* sauvages à une concentration de l'ordre de  $10^7$  cellules par mL au fil d'un cycle jour/nuit pour une concentration en 2,6-DCBQ de 75  $\mu\text{M}$  à un flux de photons incident de  $340 \mu\text{E.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ . . . . . 148
- 4.13 Fluorescence mesurée de la même manière qu'au chapitre 2 en présence de 25  $\mu\text{M}$  de 2,6-DCBQ, à  $t=0$  (en noir) et après 3 H d'incubation, courbe rouge 150
- 4.14 Schéma réactionnel des phénomènes d'excitation/désexcitation se produisant au niveau de la protéine  $P_{680}$  avec les constantes de vitesse et les flux correspondants,  $k_Q$  correspondant à la constante de vitesse du quenching par la quinone et  $k_X$  celle du quenching due à l'espèce X apparaissant au cours du temps en présence de quinone,  $F(I)$  la constante de vitesse d'excitation du  $P_{680}$  sous l'effet d'une irradiation d'une intensité égale à  $I$ . . 152

- 4.15 Quenching cinétique en fonction du temps d'exposition en secondes pour différentes quinones exogènes :PPBQ (cercles rouges), 2,5 DCBQ (triangles vers le bas roses), 2,6 DCBQ (triangles vert le haut bleu), 2,6 DMBQ (losanges verts), témoin (carrés noirs), ajustements par le modèle correspondant (ligne rouge, PPBQ  $Q_X = 3(1 - e^{-2,4 \cdot 10^{-4}t})r^2 = 0,96$ ), (ligne rouge, 2,5-DCBQ  $Q_X = 3(1 - e^{-2,5 \cdot 10^{-5}t})r^2 = 0,95$ ), (ligne bleue, 2,6-DCBQ  $Q_X = 3(1 - e^{-1,4 \cdot 10^{-5}t})r^2 = 0,92$ ). . . . . 154
- 4.16 Quenching en fonction du temps d'exposition à 25  $\mu\text{M}$  introduits de 2,6-DMBQ, simulation linéaire correspondante ( $6,1 \cdot 10^{-2} + 1,8 \cdot 10^{-5} t$ ),  $r^2 = 0,96$  155
- 4.17 Transformée linéaire du quenching cinétique en fonction du temps d'exposition en heures à la 2,6-DCBQ à des concentrations de 100 $\mu\text{M}$  (carrés noirs), 75  $\mu\text{M}$  (carrés rouges), 50  $\mu\text{M}$  (carrés bleus), 25  $\mu\text{M}$  (carrés marrons), témoin en absence de quinone (triangles verts), les ajustements linéaires correspondants sont tracés dans les mêmes couleurs. . . . . 156
- 4.18 Evolution du logarithme de la proportion de sites ouvert normalisée par sa valeur moyenne en fonction du temps d'exposition en heures, témoin (carrés noirs) cas de la PPBQ (losanges rouges), cas de la 2,5 DCBQ (triangles vers le bas roses), cas de la 2,6 DCBQ (triangles bleus), cas de la 2,6 DMBQ (losanges verts). . . . . 157
- 4.19 Evolution du logarithme de la proportion de sites ouvert normalisée par sa valeur initiale en fonction du temps d'exposition en heures à la 2,6-DCBQ à des concentrations de 100  $\mu\text{M}$  (carrés noirs), 75  $\mu\text{M}$  (carrés rouges), 50  $\mu\text{M}$  (carrés bleus), 25  $\mu\text{M}$  (carrés verts), témoin en absence de quinone carrés oranges, les ajustements linéaires correspondants sont tracés dans les mêmes couleurs avec des  $r^2$  respectifs de 0,989, 0,996, 0,996, 0,992. . . . 158
- 4.20 Courant en fonction du temps à un potentiel de travail de 650 mV/AgAgCl sur une suspension de mutants PetA ( $\Delta b_6f$ ) à une concentration de l'ordre de  $10^7$  cellules par mL au fil de différents cycles jour/nuit (flux lumineux incident de 340  $\mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ ), en présence de 2,6-DCBQ à 100  $\mu\text{M}$ . . . . . 160

4.21	Courant en fonction du temps à un potentiel de travail de 650 mV/AgAgCl sur une suspension de mutants PetA ( $\Delta b_6f$ ) à une concentration de l'ordre de $10^7$ cellules par mL au fil de différents cycles jour/nuit (flux lumineux incident de $135 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ ), en présence de 2,6-DCBQ à 100 $\mu\text{M}$ . . . . .	160
4.22	Courant en fonction du temps à un potentiel de travail de 650 mV/AgAgCl sur une suspension de mutants PetA ( $\Delta b_6f$ ) à une concentration de l'ordre de $10^7$ cellules par mL au fil de différents cycles jour/nuit (flux lumineux incident de $135 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ ), en présence de 2,6-DCBQ à 75 $\mu\text{M}$ . . . . .	161
4.23	Courant en fonction du temps à un potentiel de travail de 650 mV/AgAgCl sur une suspension de mutants PetA ( $\Delta b_6f$ ) à une concentration de l'ordre de $10^7$ cellules par mL au fil de différents cycles jour/nuit, en présence de PPBQ à 100 $\mu\text{M}$ , pour un flux de photons incident de $340 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ . . .	162
4.24	Courant en fonction du temps à un potentiel de travail de 650 mV/AgAgCl sur une suspension de mutants PetA ( $\Delta b_6f$ ) à une concentration de l'ordre de $10^7$ cellules par mL au fil de différents cycles jour/nuit . . . . .	163
4.25	Photo de la cellule photoélectrochimique utilisée . . . . .	171





# Liste des tableaux

2.1	Tableau récapitulatif des différentes constantes de quenching ( $K'$ ), partition (s) et dérivation électroniques ( $D_\infty$ et $\rho_0$ ) . . . . .	71
2.2	Tableau récapitulatif des différents paramètres déterminant la proportion de sites ouverts sur les cellules fl. . . . .	84
2.3	Tableau récapitulatif des différents paramètres déterminant la proportion de sites ouverts, sur le sauvage. . . . .	93
2.4	Tableau récapitulatif des différentes constantes de quenching, partition dérivation électronique et potentiels de demi-vague à $340 \mu E.m^{-2}.s^{-1}$ . . . . .	101
3.1	Tableau récapitulant les expressions des courants et courants limites obtenus respectivement en chronoampérométrie et en voltammétrie stationnaire (hydrodynamique ou sur UME disque) ainsi que l'expression des temps caractéristiques respectifs, avec $n_{TC}$ le nombre d'électron échangé au temps $T_C$ , F la constante de Faraday, A l'aire de l'électrode, C la concentration en solution, D le coefficient de diffusion, t le temps, w la vitesse de rotation de l'électrode, $\nu$ la viscosité cinématique de la solution, $r_0$ le rayon de l'électrode.128	
3.2	Résultats des mesures de nombre d'électrons impliqués pour les différentes quinones. . . . .	130
3.3	Tableau récapitulant les différentes valeurs de potentiel de demi-vague ( $E_{1/2}$ ), et de pic sur électrode nue ( $E_{a,nue}$ ) et polarisée ( $E_{a,pol}$ ) pour les différentes quinones. . . . .	131

4.1	Tableau récapitulatif de la nature des étapes limitantes en fonction de la zone de travail ainsi que des expressions des courants adimensionnés correspondants. . . . .	138
4.2	Tableau récapitulatif des différents courants stationnaires (en $\mu\text{A}$ ) obtenus en fonction de la concentration en 2,6-DCBQ et du flux lumineux incident, sur un mutant $\Delta b_6f$ de l'algue <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> . . . . .	149
4.3	Tableau récapitulatif des constantes de vitesses d'apparition de quencheur cinétique par empoisonnement à différentes quinones . . . . .	156
4.4	Tableau récapitulatif des constantes de vitesses d'apparition de quencheur cinétique par empoisonnement à différentes concentrations de 2,6-DCBQ .	157
4.5	Tableau récapitulatif des constantes de vitesses de diminution de la proportion de sites ouverts par empoisonnement à différentes concentrations de 2,6-DCBQ . . . . .	159

## Résumé

La photosynthèse consiste en la conversion photo-induite du dioxyde de carbone et de l'eau en matière organique et en dioxygène. Utilisée par les algues, les plantes ou certaines bactéries, la photosynthèse est pourtant intrinsèquement bridée puisque seulement 4 % de l'énergie lumineuse sont convertis en énergie chimique. Sous forte irradiation, ceci peut engendrer une dénaturation de l'appareil photosynthétique. Par ailleurs, dans le contexte environnemental actuel, cette limitation représente également une opportunité d'utiliser l'énergie non convertie sous forme d'énergie électrique. Le travail présenté dans ce manuscrit a donc pour but de créer une voie secondaire d'écoulement des électrons photosynthétiques excédentaires afin de réduire l'endommagement du système sous forte irradiation et de les transcrire sous la forme d'un photo-courant.

C'est pourquoi un système impliquant une électrode collectrice de carbone et des médiateurs redox de type quinone a été envisagé. La capacité acceptrice de certaines quinones, connues pour être de bons accepteurs du Photosystème II, a été évaluée au moyen d'études de fluorescence. La facilité de restitution des électrons dérivés par les quinones réduites a été quant à elle étudiée par électrochimie. Au bilan, les meilleures quinones (DCBQ, PPBQ) permettent d'obtenir des photocourants de l'ordre de quelques  $\mu\text{A.cm}^{-2}$ . La corrélation entre données expérimentales et théorie a également permis de mieux cerner le mécanisme de dérivation des électrons photosynthétiques par les quinones exogènes mais aussi de mettre en évidence des effets d'empoisonnement et/ou de perte d'accepteur dans les membranes.

## Summary

Photosynthesis consists in the transformation of carbon dioxide and water into organic matter and oxygen molecules. Used by algae, plants or some bacteria, photosynthesis efficiency is limited because only 4% of light energy are converted into chemical energy. Under high light conditions, this can induce photosynthetic organism diseases. Besides, in the current environmental context, this limitation is an opportunity to use the not converted energy in order to generate some electricity. The aim of the work developed in this document is to create an other photosynthetic electrons flow pathway in order to reduce system diseases under high light conditions, and to generate some photocurrent.

That's why a system with a carbon working electrode and some quinone type redox mediators has been developed. The quinone ability to accept some electrons from Photosystem II has been studied by fluorescence studies mean. Their ease-of-reoxidation by an electrode has been studied by cyclic voltametry tool. As a conclusion, the best quinones (choose by the fluorescence studies results), which are DCBQ and PPBQ let get photocurrent of several  $\mu\text{A}$ . A correlation between experimental data and theoretical predictions let us best understood the photosynthetic electrons derivation pathway and to look that poisoning and quinone partition effect occur.